

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorkommen von PCV2-Genotypen bei Schweinen im Alter
von 16 bis 24 Wochen aus Deutschland,
den Niederlanden und der Schweiz

von Katharina Maria Ratzke

aus Eggenfelden

München 2019

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Mitbetreuung durch: Dr. Matthias Eddicks und Dr. Robert Fux

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Tag der Promotion: 25. Februar 2019

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
1.	Porzines Circovirus Typ 2 (PCV2)	3
1.1.	Spezifische Eigenschaften von PCV2.....	3
1.2.	Genotypen von PCV2	3
1.3.	Taxonomie und Nomenklatur von PCV2.....	4
2.	Epidemiologie.....	5
2.1.	Vorkommen von PCV2-Genotypen	5
2.2.	Vorkommen von PCV2 in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz.....	6
2.3.	Übertragungswege	9
2.3.1.	Vertikale Übertragung	10
2.3.2.	Horizontale Übertragung.....	11
2.4.	Einflussfaktoren auf das Vorkommen von PCV2	11
2.4.1.	Andere belebte Faktoren	11
2.4.2.	Unbelebte Faktoren	12
3.	Diagnostik.....	13
3.1.	Nachweis von PCV2.....	13
3.1.1.	Genomnachweis mittels PCR.....	13
3.1.2.	Antikörpernachweis mittels ELISA	13
3.1.3.	Weitere diagnostische Verfahren	14
3.2.	Weiterführende Untersuchungen	15
3.2.1.	Genomsequenzierung.....	15
3.2.2.	Phylogenetische Analysen	15
4.	Impfung gegen PCV2	17
4.1.	Passive Immunisierung gegen PCV2	19
4.2.	Aktive Immunisierung gegen PCV2.....	20
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	23
1.	Ziel der Arbeit	23
2.	Bestandsinformationen.....	24

3.	Blutproben.....	28
4.	Fragebogen.....	28
5.	Amplifikation und Sequenzierung der PCV2-Isolate.....	29
6.	Phylogenetische Analyse.....	31
7.	Statistische Auswertung.....	33
IV.	ERGEBNISSE.....	35
1.	Auswertung der Ergebnisse auf Bestandsebene.....	35
1.1.	Molekularbiologische Untersuchungen der Serumproben	35
1.1.1.	Qualitative Auswertung von PCV2-Genom auf Bestandsebene in Abhängigkeit vom Standort.....	35
1.1.2.	Qualitative Auswertung von PCV2-Genom auf Bestandsebene in Abhängigkeit vom Impfstatus.....	37
1.2.	Vorkommen der PCV2-Genotypen und PCV2-Cluster auf Bestandsebene	37
1.2.1.	Genotypen und Cluster in den Beständen in Abhängigkeit vom Standort.....	38
1.2.2.	Genotypen und Cluster in den Beständen in Abhängigkeit vom Impfstatus.....	40
2.	Auswertung der Ergebnisse auf Einzeltierebene.....	42
2.1.	Molekularbiologische Untersuchung von PCV2-Genom aller PCV2- positiven Proben.....	42
2.2.	Auswertung der Vollgenomsequenzen.....	44
2.2.1.	Vergleichende quantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse der verschiedenen Genotypen	45
2.2.2.	Vergleichende quantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse der verschiedenen Genotypen hinsichtlich Länderzugehörigkeit und Impfstatus.....	46
2.2.3.	Vergleichende quantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse der verschiedenen Cluster hinsichtlich Länderzugehörigkeit und Impfstatus.....	48
2.2.4.	Vorkommen von Genotypen und Clustern in den Einzelseren im Zusammenhang mit dem Standort in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz	51

2.2.5.	Vorkommen von Genotypen und Clustern in den Einzelseeren im Zusammenhang mit dem Impfstatus	53
2.3.	Phylogenetische Stammbäume.....	55
V.	DISKUSSION	59
1.	Ergebnisse auf Bestandsebene.....	59
1.1.	Vorkommen PCV2-positiver Bestände.....	59
1.2.	PCV2 Genotypen und Cluster in den Beständen	61
2.	Ergebnisse auf Einzeltierebene.....	63
2.1.	Auswertung der molekularbiologischen Untersuchungen der Einzeltiere	63
2.2.	Auftreten von Genotyp und Cluster in Abhängigkeit von Land und Impfstatus	64
3.	Phylogenetische Analyse der PCV2-Genomsequenzen	66
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	69
VII.	SUMMARY	71
VIII.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	73
IX.	TABELLENVERZEICHNIS	75
X.	LITERATURVERZEICHNIS	77
XI.	ANHANG.....	99
XII.	DANKSAGUNG.....	103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
bp	base pairs, Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
CH	Schweiz
CT	cycle threshold
D	Deutschland
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FI	Ferkelimpfbestand
g	Gramm
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IIFT	indirect immunofluorescent assay, indirekter Immunfluoreszenztest
ISH	In Situ-Hybridisierung
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Med	Median
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
n	Anzahl
n.a.	nicht angegeben
NI	Nichtimpfbestand
NL	Niederlande
ORF	open reading frame
p	Signifikanzwert
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PCV	porzines Circovirus
PCV1	porzines Circovirus Typ 1
PCV2	porzines Circovirus Typ 2
PCV3	porzines Circovirus Typ 3
PCVD	porcine circovirus diseases
PDNS	porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom
PMWS	post-weaning multisystemic wasting syndrome
Q1	1. Quartil

Q3	3. Quartil
qPCR	quantitative real-time PCR
sec	Sekunden
SI	Sauenimpfbestand
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Das porcine Circovirus Typ 2 ist weltweit (SEGALÉS et al., 2007) und in allen Altersstufen (SHIBATA et al., 2003) in der Schweinepopulation verbreitet. Derzeit sind die Genotypen PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d (OLVERA et al., 2007; SEGALÉS et al., 2008; FRANZO et al., 2015a; XIAO et al., 2015) und PCV2e (HARMON et al., 2015) bekannt, eine weitere Variante des Virus wurde vor kurzem entdeckt und als PCV2f benannt (BAO et al., 2017). Die Genotypen können außerdem in Cluster unterteilt werden, wobei sich bei PCV2a fünf (PCV2a-2A-2E), bei PCV2b drei (PCV2b-1A-1C) (OLVERA et al., 2007) und bei PCV2d zwei Cluster (PCV2d-1 und PCV2d-2) (XIAO et al., 2016) unterscheiden lassen; allerdings entspricht PCV2b-1C inzwischen dem Genotypen PCV2d (FRANZO et al., 2015b). Von 1997-2003 war PCV2a der am häufigsten nachgewiesene Genotyp (ALLAN et al., 2007), seit 2004/2005 wurde vermehrt PCV2b im Zusammenhang mit porcine circovirus diseases (PCVD) nachgewiesen (GAGNON et al., 2007; CARMAN et al., 2008; DUPONT et al., 2008). In China und den USA gilt derzeit PCV2d als der am meisten verbreitete Genotyp (XIAO et al., 2016; QU et al., 2018), weswegen das Auftreten eines weiteren Genotypenshifts für wahrscheinlich gehalten wird (XIAO et al., 2016; KWON et al., 2017). Eine Impfung gegen PCV2 hat sich als erfolgreich erwiesen (FACHINGER et al., 2008; HAAKE et al., 2014), allerdings scheint eine Eradikation des Virus selbst durch Massenvakzination nicht möglich zu sein (FENG et al., 2014).

Im Rahmen der vorliegenden Studie soll durch eine retrospektive Auswertung von Serumproben das Vorkommen von PCV2-Genotypen bei Schweinen im Alter von 16 bis 24 Wochen in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz untersucht werden. Zudem soll mithilfe der Genomsequenzierung eine Übersicht gegeben werden, welchen Genotypen und Clustern die Sequenzen angehören. Weiterhin soll mittels phylogenetischer Analysen geklärt werden, ob es phylogenetische Verwandtschaftsgrade der einzelnen Sequenzen innerhalb und zwischen den Ländern gibt und ob das Vorkommen der Genotypen und Cluster

vom Land oder dem Impfstatus beeinflusst wird.

Dabei sollen folgende Arbeitshypothesen überprüft werden:

1. Aufgrund des internationalen Handels mit Schweinen und aus Schweinen gewonnenen Produkten wird angenommen, dass zwischen deutschen und niederländischen PCV2-Isolaten eine hohe Sequenzidentität besteht, während mit den PCV2-Isolaten aus der Schweiz aufgrund der isolierten Handelslage des Landes eine geringere Sequenzidentität besteht.
2. Die Impfung mittels PCV2a-basierenden Impfstoffen hat einen selektiven Einfluss auf das Vorkommen von Genotypen, weswegen in Ferkelimpfbeständen ein vermehrtes Vorkommen von PCV2b erwartet wird.
3. In Seren mit dem Genotyp PCV2b oder PCV2d ist die Viruslast im Vergleich zu Seren mit PCV2a größer.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Porzines Circovirus Typ 2 (PCV2)

Im Jahre 1974 werden von TISCHER et al. (1974) erstmalig den Papova- und Picornaviren ähnliche Viruspartikel als Kontaminanten von porzinen PK-15 Nierenzelllinien beschrieben, welche später als porcine circovirus (PCV) (TISCHER et al., 1982) benannt werden. Es handelt sich um ein kleines, unbehülltes Virus mit einem einzelsträngigen, zirkulären DNA (deoxyribonucleid acid) -Genom (TISCHER et al., 1982). Das porcine Circovirus gehört der Familie der Circoviridae an (LUKERT et al., 1995). Neben dem apathogenen porzinen Circovirus Typ 1 (PCV1) (MEEHAN et al., 1998) zählen das porcine Circovirus Typ 2 (PCV2) (MEEHAN et al., 1998) und das kürzlich entdeckte porcine Circovirus Typ 3 (PCV3) (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017) zu den porzinen Circoviren.

1.1. Spezifische Eigenschaften von PCV2

Insgesamt werden bei PCV2 elf sogenannte open reading frames (ORF) vermutet (HAMEL et al., 1998), wobei es zwei Hauptleseraster gibt: ORF1 (das *rep*-Gen) codiert für die Replikationsproteine Rep und Rep' (MANKERTZ et al., 1998; CHEUNG, 2003), während ORF2 (das *cap*-Gen) für das Kapsidprotein codiert, das eine Größe von 30 kDa besitzt (NAWAGITGUL et al., 2000). ORF3 codiert für ein Protein, das aktiv in apoptotische Vorgänge involviert ist (LIN et al., 2011) und somit an der viralen Pathogenese im Wirtsorganismus mitwirkt (LIU et al., 2006). ORF4 verhindert die Apoptose in Wirtszellen (LV et al., 2016). Es wird vermutet, dass der kürzlich entdeckte ORF5 ebenfalls die PCV2-Infektion beeinflusst (LV et al., 2015).

1.2. Genotypen von PCV2

Die Unterscheidung der Genotypen erfolgt anhand des sogenannten „signature motif“ (CHEUNG et al., 2007) des ORF2 (NAWAGITGUL et al., 2000). Die Länge des Gesamtgenoms liegt für PCV2a bei 1768 bp (FRANZO et al., 2015a), für PCV2b, c, d und f bei 1767 bp (CHEUNG et al., 2007; GUO et al., 2010; BAO et al., 2017) und für PCV2e bei 1777 bp

(DAVIES et al., 2016). Anhand der ORF2-basierten Klassifikation findet mithilfe markierter Nukleotidpositionen eine schnelle und günstige Genotypendifferenzierung statt (FRANZO et al., 2015b).

1.3. Taxonomie und Nomenklatur von PCV2

Nach der Erstbeschreibung (TISCHER et al., 1974) und genaueren Charakterisierung des porcinen Circovirus (TISCHER et al., 1982), wird zuerst zwischen PCV1 und PCV2 unterschieden (MEEHAN et al., 1998). Danach erfolgt eine uneinheitliche Einteilung von PCV2 in Sub- und Genotypen: Von GAGNON et al. (2007) werden die beiden Genotypen PCV2a und PCV2b im Zusammenhang mit einer steigenden Zahl an PCVD-Fällen in Kanada detektiert; auch CHEUNG et al. (2007) können zwei verschiedene Genotypen in Proben aus den USA nachweisen und bezeichnen sie als Gruppe 1 (PCV2b) und Gruppe 2 (PCV2a). OLVERA et al. (2007) unterteilen die zwei bekannten Gruppen (=Genotypen) von PCV2 in sogenannte Subcluster, wobei Gruppe 2 (=PCV2a) in fünf (2A bis 2E) und Gruppe 1 (= PCV2b) in drei (1A bis 1C) Cluster unterteilt wurde (OLVERA et al., 2007) und schließlich wird von einem internationalen Konsortium die einheitliche Benennung der beiden Genotypen als PCV2a und PCV2b vorgeschlagen (SEGALÉS et al., 2008).

Im Rahmen einer retrospektiven Studie von DUPONT et al. (2008) wird ein weiterer Genotyp beschrieben und später als Genotyp PCV2c benannt (SEGALÉS et al., 2008). Dieser Genotyp kann zunächst nur einmalig in Proben von dänischen Schweinen aus den 1980er Jahren (DUPONT et al., 2008) nachgewiesen werden. In Anlehnung an die Benennung von OLVERA et al. (2007) wird dieser Genotyp als Gruppe 3 bezeichnet (DUPONT et al., 2008). Im Jahr 2015 wird der Genotyp PCV2c erstmals bei lebenden verwilderten Hausschweinen in Brasilien entdeckt (FRANZO et al., 2015a) und in China werden etwa zum gleichen Zeitpunkt Rekombinanten, bestehend aus PCV2c mit PCV2b identifiziert. (LIU et al., 2016).

Im Jahre 2010 wird eine neue Variante von PCV2 in China entdeckt. (GUO et al., 2010). GUO et al. (2010) untersuchen im Rahmen ihrer retrospektiven Studie Serum- und Gewebeproben von klinisch erkrankten Schweinen aus den Jahren 2004-2008 und können PCV2d erstmals als

neuen Genotyp nachweisen. Auch XIAO et al. (2015) bezeichnen PCV2d als eigenständigen Genotypen, während CHAE (2015) PCV2d als Mutante von PCV2b (mPCV2b) beschreibt. Seit 2015 wird PCV2d zusammen mit bereits zuvor bekannten Viren als eigenständiger Genotyp geführt und PCV2b-1C als PCV2d bezeichnet (FRANZO et al., 2015b). Außerdem weisen XIAO et al. (2016) PCV2d zwei Untergruppen, PCV2d-1 und PCV2d-2 zu.

HARMON et al. (2015) detektieren im Rahmen ihrer Untersuchungen PCV2e in Proben mexikanischer Schweine. Außerdem wird PCV2e während einer retrospektiven Studie in den USA identifiziert, wobei die älteste Sequenz aus dem Jahre 2006 stammt (DAVIES et al., 2016). Von BAO et al. (2017) wird eine neue Virusvariante entdeckt, die als sechster Genotyp vorgeschlagen und mit PCV2f benannt wird.

2. Epidemiologie

2.1. Vorkommen von PCV2-Genotypen

Während PCV2a vor allem in den Jahren 1997-2003 nachzuweisen ist (ALLAN et al., 2007), kann im Zusammenhang mit dem vermehrten Auftreten des post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Kanada in den Jahren 2004/2005 erstmals eine neue Virusvariante (PCV2b) detektiert werden (GAGNON et al., 2007). Deren Nachweishäufigkeit nimmt seit 2004/2005, zumeist verbunden mit Fällen von PCVD, weltweit zu (GAGNON et al., 2007; CARMAN et al., 2008; DUPONT et al., 2008; TIMMUSK et al., 2008; WANG et al., 2009; WIEDERKEHR et al., 2009; CORTEY et al., 2011). PCV2c wird lediglich retrospektiv in Proben aus Dänemark aus den Achtzigerjahren (DUPONT et al., 2008) und im Jahr 2015 bei lebenden verwilderten Hausschweinen in Brasilien detektiert (FRANZO et al., 2015a).

Im Jahr 2010 wird in China in Fällen von PCVD eine neue Virusvariante beschrieben (GUO et al., 2010), wie auch 2013 in den USA (OPRIESSNIG et al., 2013a) und in Deutschland (EDDICKS et al., 2015). Diese Virusvariante wird anfangs als PCV2b-1C (OLVERA et al., 2007) bzw. als mutantPCV2b (XIAO et al., 2012; OPRIESSNIG et al., 2013a) benannt und wird nun zusammen mit bereits zuvor bekannten Viren (GUO et al., 2010)

als Genotyp PCV2d bezeichnet (FRANZO et al., 2015b). Vergleichbar mit dem Genotypenshift von PCV2a zu PCV2b zum dominierenden Genotypen weltweit (CHEUNG et al., 2007; GAGNON et al., 2007) um 2004/2005 (DUPONT et al., 2008), wird PCV2d derzeit vermehrt nachgewiesen (XIAO et al., 2015). In den USA (XIAO et al., 2016) und China (QU et al., 2018) gilt PCV2d deshalb bereits als vorherrschender Genotyp. Außerdem vermuten GUO et al. (2012) aufgrund von Infektionsversuchen, dass PCV2d eine höhere Virulenz aufweist als PCV2a und PCV2b. OPRIESSNIG et al. (2014) hingegen können im Rahmen ihrer Studie, bei der Ferkel mit verschiedenen PCV2-Genotypen (PCV2a, PCV2b oder PCV2d) experimentell infiziert werden, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Virulenz von PCV2d feststellen.

Nach der Erstbeschreibung von PCV2e durch HARMON et al. (2015) wird dieser Genotyp bisher nur vereinzelt beschrieben (DAVIES et al., 2016; LIU et al., 2018). Außerdem erfordert es noch weitere Untersuchungen, um Aussagen über seine Pathogenität treffen zu können (LIU et al., 2018). Auch zum Vorkommen von PCV2f ist bisher nur der einmalige Nachweis im Rahmen einer retrospektiven Studie klinischer Gewebeproben in China bekannt (BAO et al., 2017).

2.2. Vorkommen von PCV2 in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz

Im Rahmen einer retrospektiven Studie von JACOBSEN et al. (2009) wird Probenmaterial von Schweinen aus Norddeutschland, das in einem Zeitraum zwischen 1961 und 1998 bei Sektionen entnommen worden ist, untersucht. Dabei werden von 18855 Tieren, unter Berücksichtigung von Alter (4 bis 16 Wochen) und Gewicht (unter 50 kg), 445 Schweine in die Untersuchung eingeschlossen (JACOBSEN et al., 2009). Ein weiteres Kriterium für die Auswahl stellt das Auftreten von Befunden wie Lymphknotenvergrößerung, Lymphozytendepletion in lymphatischen Geweben, interstitielle Pneumonien und interstitielle Nephritiden dar (JACOBSEN et al., 2009). Dabei wird herausgefunden, dass der Anteil an PCV2-positiven Tieren von 1985 (14,3 % auf 53,3 %) bis 1998 stark gestiegen ist (JACOBSEN et al., 2009). In einer Untersuchung aus Bayern

von RITZMANN et al. (2002) kann in den Jahren 1999 bis 2001 bei 187 (61 %) von 304 Schweinen verschiedener Altersgruppen mittels polymerase chain reaction (PCR) sowohl im rechten Lungenspitzenlappen als auch im Inguinallymphknoten PCV2 nachgewiesen werden. Die Tiere weisen vorberichtlich Symptome und klinische Anzeichen wie Kümmeren, Pneumonien, Enteritis, Fruchtbarkeitsstörungen, PDNS (porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom) oder sonstige Probleme (PMWS-untypische Krankheitsbilder wie Arthritiden, Lahmheiten oder Enterotoxämie) auf.

Zur Untersuchung vom PCV2-Vorkommen in Wildschweinen wird in einer deutschen Studie das PCV2-Vorkommen in Proben von erlegten Wildschweinen und Hausschweinen im Rahmen der Schlachtung (das durchschnittliche Gewicht bei der Schlachtung betrug 32,4 kg) im Vergleich untersucht (REINER et al., 2010). Dabei erweisen sich in der quantitative real-time PCR (qPCR) 45,4 % der Wildschweine und 98,8 % der Hausschweine als PCV2-positiv (REINER et al., 2010). Auch HAMMER et al. (2012) kommen bezüglich des PCV2-Vorkommens zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie untersuchen 203 Wildschweinproben aus Baden-Württemberg, aus den Jahren 2008 und 2009 und detektieren dabei im Organmaterial von 103 Schweinen mittels qPCR PCV2-DNA, woraus sich eine Prävalenz von 50,7 % ergibt (HAMMER et al., 2012).

Um eine Aussage über das Vorkommen von PCV2 in Sperma von Besamungsebern treffen zu können, untersuchen SCHMOLL et al. (2008) deutsche und österreichische Eber. In 50 von 272 untersuchten deutschen und in 36 von 200 von untersuchten österreichischen Spermaproben kann dabei PCV2-DNA mittels nested-PCR nachgewiesen werden (SCHMOLL et al., 2008).

Zur Beurteilung des PCV2-Vorkommens bei Schweinen im Bereich der Abferkelung, untersuchen EDDICKS et al. (2016) 20 bayerische Ferkelerzeugerbetriebe. Dabei findet die Arbeitsgruppe heraus, dass in Süddeutschland die Prävalenz bezüglich PCV2-DNA und PCV2-Antikörper in den untersuchten Proben (Blut, Speichel, Fäzes, Urin) positiver Sauen niedriger ist als erwartet (1 % bzw. 19,7 %) (EDDICKS et al., 2016). Um die intrauterine Übertragung von PCV2 durch die Sau auf die Ferkel zu untersuchen, werden zudem Ferkel

ungeachtet ihres PCV2-Status zufällig ausgewählt (EDDICKS et al., 2016). Dabei ist bekannt, dass alle Betriebe die Ferkel gegen PCV2 impfen (EDDICKS et al., 2016). Alle 590 Blutproben der neugeborenen Ferkel erweisen sich als negativ in Bezug auf PCV2-IgG-Antikörper (Immunglobulin G) und PCV2-DNA (EDDICKS et al., 2016).

In den Niederlanden beschreiben WELLENBERG et al. (2000) erstmals die Isolation von PCV2 in Schweinen mit PMWS-assoziiertem Krankheitsgeschehen. In einer späteren Studie werden 60 Schweine mit klinischen Anzeichen von PMWS (Kümmern, Blässe, Fieber, respiratorische Problematik oder vergrößerte Inguinallymphknoten) untersucht (WELLENBERG et al., 2004). Diese werden mit 3 klinisch gesunden Kontrollgruppen („gleiche Bucht“, „andere Bucht + gleiche Herde“, „PMWS-freie Herde“) mit jeweils 60 Tieren verglichen (WELLENBERG et al., 2004). Dabei wird mithilfe einer qPCR in 100 % der Schweine mit klinischen Anzeichen und in 50 % der Kontrollgruppe „PMWS-freie Herde“ PCV2-DNA detektiert (WELLENBERG et al., 2004). In einer Untersuchung der Blutproben von 44 Sauen und von 352 neugeborenen Ferkeln in endemisch mit PCV2 infizierten Beständen in den Niederlanden werden die Ergebnisse von EDDICKS et al. (2016) bestätigt, da in keinem der Tiere mittels qPCR PCV2 nachgewiesen werden kann (DIESTE-PÉREZ et al., 2018). Die Blutproben der Sauen werden zusätzlich mittels enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) untersucht, wodurch bei 13 von 44 Sauen IgG-Antikörper gegen PCV2 nachgewiesen werden können (DIESTE-PÉREZ et al., 2018). Infolge dieser Studie schätzen DIESTE-PÉREZ et al. (2018) die Prävalenz bei neugeborenen Ferkeln in endemisch infizierten Beständen in den Niederlanden als eher niedrig ein.

In der Schweiz wird zum ersten Mal im Jahre 2001 von PMWS-Fällen berichtet (BOREL et al., 2001). WIEDERKEHR et al. (2009) stellen einen massiven Anstieg des mit PCV2 assoziierten Krankheitsgeschehens im Jahr 2003 fest. Dies scheint auch mit dem in der Studie dominierenden Vorkommen von PCV2b bei kranken oder subklinisch infizierten Tieren zusammen zu hängen (WIEDERKEHR et al., 2009). BAUMGARTNER et

al. (2012) vergleichen Schweine aus 30 Beständen mit PMWS-Krankheitsgeschehen mit Tieren aus 30 unauffälligen Beständen und stellen dabei fest, dass Absetzferkel aus Beständen mit PMWS-Krankheitsgeschehen signifikant mehr PCV2-DNA-Kopien pro Milliliter (ml) Serum enthalten als Ferkel aus unauffälligen Beständen. In einer retrospektiven Studie mit 538 Proben von Beständen mit PMWS-Krankheitsgeschehen aus den Jahren 2003-2006 kommen WELTI et al. (2012) zudem zu der Auffassung, dass PCV2 vermehrt in Schweinen und Beständen nachgewiesen wird, die aus schweinedichten Regionen stammen (Ostschweiz und der Kanton Luzern). Außerdem sind Tiere aus Ferkelaufzuchtbetrieben häufiger von PMWS betroffen als Zucht- oder Mastbetriebe, wobei hier größere Betriebe mit über 50 Muttersauen bzw. über 500 Mastschweinen signifikant häufiger betroffen sind (WELTI et al., 2012).

Eine schweizerische Studie untersucht 286 Feten und Plazenten von 113 Muttersauen hinsichtlich infektiöser Ursachen für Fruchtbarkeitsstörungen mit Aborten, vermehrt mumifizierten oder totgeborenen und lebensschwachen Ferkeln (HANDKE et al., 2012). Auch hier kann nur bei 5 von 113 Fällen (ein Fall entspricht einer Sau mit zugehörigen Ferkeln) mittels Immunhistochemie (IHC) an Paraffinschnitten von Gewebeproben der Ferkel (Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Mesenteriallymphknoten, Thymus, Gehirn und Plazenta) PCV2 nachgewiesen werden (HANDKE et al., 2012). Demzufolge scheint PCV2 als Ursache bei Fruchtbarkeitsproblemen auch in der Schweiz keine große Bedeutung zu haben (HANDKE et al., 2012).

2.3. Übertragungswege

PCV2 kann sowohl horizontal als auch vertikal über Se- und Exkrete eines infizierten Schweins übertragen werden. Dazu zählen z. B. Se- und Exkrete des Respirations- und Gastrointestinaltrakts (MAGAR et al., 2000; SHIBATA et al., 2003; CHIOU et al., 2011; ROSE et al., 2012), aber auch Sperma (SCHMOLL et al., 2008), Urin (SEGALÉS et al., 2005), Kolostrum und Milch (SHIBATA et al., 2006; GERBER et al., 2011).

2.3.1. Vertikale Übertragung

Erste Vermutungen über eine mögliche intrauterine Übertragung von PCV2 auf die Ferkel stellen WEST et al. (1999) an. Sie weisen PCV2-Antigen im Myokard von spätabortierten, totgeborenen und mumifizierten Ferkeln nach, während gleichzeitig andere Aborterreger ausgeschlossen werden (WEST et al., 1999). PARK et al. (2005) legen in ihrer Studie dar, dass eine transplazentare Übertragung des Erregers auf die Ferkel über das zuvor infizierte Muttertier möglich ist. SHEN et al. (2010) können mittels der präkolostralen Entnahme von Blut bei Ferkeln belegen, dass darin sowohl PCV2-DNA als auch Anti-PCV2-IgG-Antikörper vorhanden sind. DVORAK et al. (2013) berichten, dass beinahe zwei Drittel der von ihnen beprobten neugeborenen Ferkel bereits vor der Kolostrumaufnahme virämisch sind. Dieses Ergebnis können EDDICKS et al. (2016) nicht nachvollziehen, die den Anteil virämisch geborener Ferkel in Bayern im Verlauf ihrer Studie untersuchen. Dabei kommt die Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass die diaplazentare Infektion eine geringere Rolle spielt, während eine Infektion der Ferkel im Verlauf der Säugephase oder über die Umwelt für wahrscheinlicher gehalten wird (EDDICKS et al., 2016). Eine weitere Infektionsmöglichkeit bietet das Kolostrum selbst oder auch ein durch die Muttersauen mit PCV2 kontaminiertes Lebensumfeld der Neugeborenen (GERBER et al., 2011; DVORAK et al., 2013).

Während einer in Österreich und Deutschland durchgeführten Studie bei Besamungsebern wird bei 18,2 % der 472 Spermaproben PCV2-DNA nachgewiesen (SCHMOLL et al., 2008). In einer schweizerischen Untersuchung kommt unter anderem PCV2-infiziertes Sperma als wahrscheinliche Infektionsquelle für Zuchtbetriebe in Frage (WELTI et al., 2012). Dieser Vermutung widerspricht ein Infektionsversuch, in dem PCV2-freie Jungsauen mit PCV2-positivem Sperma künstlich besamt werden (MADSON et al., 2009b). Bei den Jungsauen wird weder in den Serumproben noch in im Rahmen der Sektion untersuchtem Gewebe PCV2 detektiert und auch in den Serumproben der Ferkel können weder PCV2-DNA noch PCV2-Antikörper detektiert werden (MADSON et al., 2009b). In einer Folgestudie kommen MADSON et al. (2009a) jedoch zu einem anderen Ergebnis. Hier können sowohl im Serum der mit PCV2-

positivem Sperma künstlich besamten Jungsauern als auch in dem Serum der neugeborenen Ferkel PCV2-Antikörper detektiert werden (MADSON et al., 2009a).

2.3.2. Horizontale Übertragung

Eine Tier-zu-Tier-Transmission erfolgt bei PCV2 mittels Se- und Exkreten, wie Nasensekret (SEGALÉS et al., 2005), Kot (DUPONT et al., 2009) und Speichel (PATTERSON et al., 2011) welche oronasal (SHIBATA et al., 2003; DUPONT et al., 2009), direkt oder indirekt von Tier zu Tier übertragen werden können (DUPONT et al., 2009; DVORAK et al., 2013).

BOLIN et al. (2001) infizieren Ferkel, die durch Kaiserschnitt entwickelt wurden und kein Kolostrum erhalten haben, intranasal und subkutan mit PCV2. Am 12. bis 19. Tag nach der Infektion wird sporadisch PCV2 in Nasen-, Tonsillen- und Kottupfern nachgewiesen (BOLIN et al., 2001). Zudem wird in Lungenspülproben sporadisch PCV2 gefunden (BOLIN et al., 2001). Bei zu diagnostischen Zwecken untersuchten Schweinen finden SEGALÉS et al. (2005) PCV2 ebenfalls in respiratorischen und oralen Sekreten, sowie im Kot und Urin. Auch SHIBATA et al. (2003) schätzen die Übertragung auf respiratorischem und oralem Weg als bedeutend ein. In Hinblick auf die Verbreitung von PCV2 halten DUPONT et al. (2009) den direkten Kontakt mit Kot und Urin, sowie frequenten Nasenkontakt für sehr relevant.

2.4. Einflussfaktoren auf das Vorkommen von PCV2

2.4.1. Andere belebte Faktoren

Neben der direkten und indirekten Übertragung von Schwein zu Schwein (DUPONT et al., 2009; DVORAK et al., 2013) kann sich PCV2 in Mäusen replizieren (KIUPEL et al., 2001) und direkt von Maus zu Maus übertragen werden (CSAGOLA et al., 2008). Auch LI et al. (2010) kommen zu dem Ergebnis, dass die virale Replikation in infizierten Mäusen möglich ist. Die Möglichkeit der Transmission des Erregers von Mäusen auf Schweine scheint nicht ausgeschlossen zu werden, da sich die Tiere über einen gewissen Zeitraum hinweg als virämisch erwiesen haben und somit als Reservoir für PCV2 dienen können (OPRIESSNIG et

al., 2009).

In einer Feldstudie, in der Nager in PCV2 positiv geltenden Beständen gesammelt und untersucht werden, wird mittels PCR das Virus in 65 % der Mäuse und 24 % der Ratten gefunden, was ein potentielles Risiko für eine indirekte Übertragung darstellen kann (LORINCZ et al., 2010). Auch ZHAI et al. (2016) weisen bei 31,6 % der im Rahmen ihrer Studie in konventionellen Schweinebeständen in China gefangenen und später euthanasierten Ratten PCV2-DNA nach. Auch in Südkorea können mittels PCV2-spezifischer PCR 14,7 % von Nagern, die im Umkreis von Schweinebeständen gesammelt wurden, positiv auf PCV2 getestet werden (TRUONG et al., 2013).

Das Wildschwein ist neben dem Hausschwein ebenfalls empfänglich für PCV2 (ELLIS et al., 2003) und kann damit auch eine Rolle in der Epidemiologie des Virus spielen (ROSE et al., 2012), wobei die Bedeutung der wildlebenden Verwandten des Hausschweins für die Verbreitung des Virus nicht geklärt ist (VICENTE et al., 2004). LIPEJ et al. (2007) vermuten, dass das Hausschwein als Reservoir für PCV2 dient und somit eher eine Übertragung von der domestizierten Spezies auf die wildlebende Spezies stattfindet.

2.4.2. Unbelebte Faktoren

VERREAULT et al. (2010) können in Luftproben, die mittels Gelatinefilter in Schweineställen genommen wurden, PCV2-DNA nachweisen. In einer Schweizer Studie wird aufgrund einer lokalen und temporären Anhäufung PCV2-infizierter Tiere im nördlichen Teil eines Kantons vermutet, dass PCV2 sich aerogen verbreiten kann, wobei nicht weiter erläutert wird, ob andere Übertragungswege ausgeschlossen wurden (WELTI et al., 2012).

3. Diagnostik

3.1. Nachweis von PCV2

3.1.1. Genomnachweis mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion wird als schnelle und sensitive Methode zum Nachweis von PCV2-DNA angesehen (HAMEL et al., 2000). CALSAMIGLIA et al. (2002) bezeichnen die PCR aus den *Lnn. superficiales* als die sensitivste Methode zur Feststellung einer PCV2-Infektion. In epidemiologischen Studien hingegen ist die Gewinnung von Serumproben praktikabler, da es möglich ist, sie auch am lebenden Tier zu gewinnen (CALSAMIGLIA et al., 2002). Außerdem scheint PCV2 im Vollblut über einen längeren Zeitraum vorhanden zu sein, weswegen SHIBATA et al. (2003) Vollblut und Serum infizierter Schweine für das am besten geeignete Material für eine PCR halten. Für die Untersuchung auf PCV2-DNA mittels PCR sind verschiedene Gewebe wie Lunge, Tonsillen und Lymphknoten (HAMEL et al., 2000) oder Serum (CALSAMIGLIA et al., 2002) geeignet. SEGALÉS et al. (2005) können PCV2-DNA mittels quantitativer TaqMan PCR zudem in Tracheobronchial-, Tonsillen-, Nasen-, Fäkal- und Harntupferproben und Serum detektieren. Durch technische Fortschritte wie den höheren Automatisierungsgrad, die schnellere Abwicklung und geringere Kosten wird die PCR anderen vergleichbaren Verfahren vorgezogen (OPRIESSNIG & LANGOHR, 2013).

Da das Auftreten PCV2-bedingter Erkrankungen mit der Höhe der Viruslast korreliert, besitzen quantitative Nachweismethoden einen deutlichen Vorteil (BRUNBORG et al., 2004). Um die Anzahl der vorhandenen Genomkopien von PCV2 zu bestimmen, werden PCV2-DNA-positive Proben mit einer standardisierten Verdünnungsreihe in Reaktion gebracht, um danach die Quantität zu errechnen (SEGALÉS et al., 2005).

3.1.2. Antikörpernachweis mittels ELISA

Den ersten indirekten kompetitiven ELISA (c-ELISA) zum Antikörpernachweis von PCV2 in Schweineserum beschreiben WALKER et al. (2000). Sie kommen zu dem Schluss, dass dieses Verfahren eine hohe Sensitivität und Spezifität besitzt und zudem zur Untersuchung

großer Probenzahlen geeignet ist (WALKER et al., 2000). Im Unterschied dazu entwickeln NAWAGITGUL et al. (2002) zwei weitere modifizierte indirekte Sandwich-ELISA-Testverfahren: bei dem einen wird ein von PCV2-infizierten PK-15-Zellen stammendes Antigen verwendet, während bei dem anderen ELISA das ORF2-Kapsidprotein als Antigen dient (NAWAGITGUL et al., 2002). Beide Verfahren sind hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität vergleichbar mit einem indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT, indirect immunofluorescent assay) (NAWAGITGUL et al., 2002). Aufgrund der ubiquitären Verbreitung von PCV2 (SEGALÉS et al., 2007) ist der qualitative Nachweis von Antikörpern gegen PCV2 allein nicht ausreichend, um die Diagnose PMWS zu stellen (SEGALES, 2012), da auch klinisch gesunde Tiere PCV2-Antikörper aufweisen (RODRIGUEZ-ARRIOJA et al., 2003).

3.1.3. Weitere diagnostische Verfahren

Bei der Immunhistochemie kann PCV2-Antigen in formalin-fixiertem Probenmaterial mittels Bindung von markierten Antikörpern detektiert werden (MCNEILLY et al., 1999). KIM et al. (2009) vergleichen monoklonale und polyklonale Antikörper, wobei sich erstere als spezifischer erweisen.

Im Vergleich zur IHC lagert sich bei der In Situ-Hybridisierung eine komplementäre Sonde aus Nukleinsäure an das Virusgenom oder an die virale messenger- RNA (mRNA) (YU et al., 2007) an, die durch eine Farbreaktion (ROSELL et al., 1999) oder durch Fluoreszenz (KHAISEB et al., 2011) sichtbar wird.

KIM et al. (2009) bewerten die ISH gegenüber der IHC als sensitivere Methode für den Nachweis von PCV2. Zu dem gleichen Ergebnis kommt auch eine andere Arbeitsgruppe (SEO et al., 2014), die mittels ISH außerdem zwischen PCV2a und PCV2b differenziert. Laut SEO et al. (2014) gelten beide Untersuchungsmethoden (ISH und IHC) zudem als äußerst wertvoll, um die Diagnose PMWS zu verifizieren. SZCZOTKA et al. (2011) weisen bei der Immunhistochemie an Lymphknoten quantitativ mehr positive Signale nach als bei der In Situ-Hybridisierung.

3.2. Weiterführende Untersuchungen

3.2.1. Genomsequenzierung

Unter Genomsequenzierung wird im Allgemeinen die Bestimmung der genauen Reihenfolge von Nukleotiden innerhalb eines DNA-Moleküls verstanden (BISHT & PANDA, 2014). Die Genomlänge des porcinen Circovirus Typ 2 wird mit 1766 bis 1777 Nukleotiden beschrieben (HAMEL et al., 1998; MEEHAN et al., 1998; DAVIES et al., 2016). Während PCV2b, c, d und f eine Genomlänge von 1767 bp aufweisen (CHEUNG et al., 2007; GUO et al., 2010; BAO et al., 2017), ist das Genom von PCV2a 1768 bp (FRANZO et al., 2015a) und das von PCV2e 1777 bp (DAVIES et al., 2016) lang. In einer von LAROCHELLE et al. (2002) durchgeführten Studie zeigt sich, dass die Nukleotide im Bereich des ORF2 (93-100 % Homologie der Sequenzen in diesem Genabschnitt) variabler sind als bei ORF1 (97-100 % Homologie der Sequenzen in diesem Genabschnitt). DUPONT et al. (2008) können mittels Genomsequenzierung zeigen, dass in Dänemark eine homogene PCV2-Population vorhanden zu sein scheint, da zwischen 45 detektierten Gesamtgenomsequenzen eine Homologie von 99,4-100 % vorhanden ist.

3.2.2. Phylogenetische Analysen

Die größte Anwendung finden phylogenetische Studien in Bezug auf virale Erkrankungen von Nutztieren im Bereich der molekularen Epidemiologie (OLVERA et al., 2010). OLVERA et al. (2007) vermuten, dass ORF2 ein verlässlicher phylogenetischer Marker ist, da die Arbeitsgruppe basierend darauf einen mit dem Gesamtgenom übereinstimmenden phylogenetischen Stammbaum konstruieren kann. Zu dem gleichen Ergebnis kommen auch WANG et al. (2009). Außerdem wird in einer späteren Studie herausgefunden, dass der phylogenetische Stammbaum, der anhand des PCV2-Kapsid-Gens erstellt wird, eine höhere Ähnlichkeit mit dem des Gesamtgenoms aufweist, als der Stammbaum der mithilfe des Rep-Gens erstellt wird (WANG et al., 2013). Aufgrund der Tatsache, dass das Kapsid-Gen der exponierteste Teil des Virus ist und am wahrscheinlichsten mit dem Immunsystem des Wirtes interagiert, weist es im Gegensatz zum Rep-Gen eine höhere Variabilität

auf, was es geeigneter für die phylogenetischen Analysen macht (OLVERA et al., 2007). Auch LAROCHELLE et al. (2002) detektieren im Rahmen ihrer Studie bei ORF2 eine höhere Nukleotidvariabilität als bei ORF1 und nehmen ebenfalls an, dass es mit der Virus-Wirt-Interaktion zusammenhängt.

Mithilfe phylogenetischer Analysen von Gesamtgenomsequenzen können LAROCHELLE et al. (2002) in ihrer Studie zwei große Gruppen hinsichtlich der Verwandtschaftsgrade der Vollgenome innerhalb ihres phylogenetischen Stammbaumes definieren. Dabei fällt auf, dass in der ersten Gruppe europäische Sequenzen phylogenetische Verwandtschaftsgrade mit kanadischen Sequenzen aufweisen (LAROCHELLE et al., 2002). Außerdem scheint ein Teil kanadischer Sequenzen eng verwandt zu sein mit deutschen Isolaten (LAROCHELLE et al., 2002). DE BOISSESON et al. (2004) stellen in ihrer Studie die phylogenetischen Beziehungen von 47 Vollgenomsequenzen dar, wobei 23 Sequenzen aus der vorhandenen Untersuchung französischer Proben stammen und 24 Sequenzen zum Vergleich aus der GenBank herangezogen werden, die aus Frankreich, den Niederlanden, dem Vereinigten Königreich, Taiwan, China, den USA, Japan, Kanada, Spanien, Südkorea und Deutschland stammen. Dabei werden zwei Hauptgruppen eng miteinander verwandter Sequenzen (Cluster I und Cluster II) definiert (DE BOISSESON et al., 2004). Die Untersuchung zeigt, dass alle aus der Studie stammenden französischen Sequenzen, dem Cluster I im phylogenetischen Stammbaum angehören, genauso wie ein Teil der aus der GenBank stammenden europäischen Vergleichssequenzen (DE BOISSESON et al., 2004). Auffällig bei der Untersuchung von DE BOISSESON et al. (2004) ist dabei ein hoher Verwandtschaftsgrad der Sequenzen (> 99 % Übereinstimmung auf Nukleotidebene).

4. Impfung gegen PCV2

Sowohl die Impfstoffe für die Sauenimpfung als auch die Impfstoffe für die Ferkelimpfung, die derzeit in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz zugelassen sind, basieren auf den PCV2 Genotypen PCV2a und PCV2b (es ist nur ein auf PCV2b-basierender Impfstoff zugelassen, der allerdings nicht in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz verfügbar ist) und gelten als effiziente Prophylaxe vor einer Infektion mit PCV2a oder PCV2b (OPRIESSNIG et al., 2007). OPRIESSNIG et al. (2008a) können die Kreuzprotektivität zwischen PCV2a und PCV2b unter Verwendung verschiedener PCV2-Isolate in einer experimentellen Studie nachweisen (OPRIESSNIG et al., 2008a). Allerdings verweisen MADEC et al. (2008) darauf, dass sich experimentelle Studien hinsichtlich der Ergebnisse von Feldstudien unterscheiden. In einer experimentellen Studie zeigen OPRIESSNIG et al. (2017), dass ein auf PCV2a-basierender Impfstoff sich auch als wirksam gegen PCV2d erweist, da er die durch PCV2d verursachte Virämie und die Virusausscheidung auf nasalem und fäkalem Weg verringert. Allerdings weisen FENG et al. (2014) darauf hin, dass eine vollständige Eradikation von PCV2 durch Impfung nicht möglich ist, aber den Infektionsdruck nachweisbar senkt.

Zum jetzigen Zeitpunkt (Stand 2018) sind in Deutschland und den Niederlanden zehn kommerzielle Impfstoffe zur PCV2-Vakzinierung zugelassen, wobei es sich teilweise um Kombinations-Impfstoffe mit *Mycoplasma hyopneumoniae* handelt (siehe Tabelle 1). In der Schweiz gibt es fünf zugelassene Impfstoffe, welche Tabelle 2 zu entnehmen sind. Verfügbar sind derzeit alle Impfstoffe außer Cirbloc® (basiert auf PCV2b), der in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz nicht verwendet wird.

Tabelle 1: Aufstellung des Paul-Ehrlich-Institutes der in Deutschland und des College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG-MEB) der in den Niederlanden zugelassenen Impfstoffe gegen PCV2 ((a)=basierend auf dem Genotypen PCV2a, (b)=basierend auf dem Genotypen PCV2b)) (2018).

Bezeichnung	Zulassungsinhaber	Anwendung
Cirbloc[®]_(b)	CEVA Tiergesundheit GmbH	Vakzinierung von Schweinen ab einem Alter von 3 Wochen
Circovac[®]_(a)		Vakzinierung von Schweinen ab einem Alter von 3 Wochen und Zuchtsauen
Ingelvac[®] CircoFLEX_(a) Ingelvac[®] PCV Flex_(a)	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH	Vakzinierung von Schweinen ab einem Alter von 2 Wochen
Porcilis[®] PCV_(a)	Intervet International B.V., Niederlande	Vakzinierung von Ferkeln, one shot (Alter 3 Wochen) oder two shot (3.- 5. LT und 2- 3 Wochen später)
Porcilis[®] PCV ID_(a)		Intradermale Vakzinierung ab einem Alter von 3 Wochen
Porcilis[®] PCV M Hyo[*]_(a)		Vakzinierung von Schweinen ab einem Alter von 3 Wochen
Suvaxyn[®] Circo_(a) Suvaxyn[®] Circo + MH RTU[*]_(a) Suvaxyn[®] PCV_(a)	Zoetis Belgium S.A., B	Vakzinierung von Schweinen ab einem Alter von 3 Wochen

*Kombi-Impfstoff

Tabelle 2: Aufstellung des Tierarzneimittel Kompendium der Schweiz der in der Schweiz zugelassenen Impfstoffe gegen PCV2 (2018).

Name	Zulassungsinhaber	Anwendung
Circovac[®] (a)	CEVA Tiergesundheit GmbH	Vakzinierung von Schweinen ab einem Alter von 3 Wochen und Zuchtsauen
Ingelvac[®] CircoFLEX(a)	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH	Vakzinierung von Schweinen ab einem Alter von 2 Wochen
Porcilis[®] PCV(a)	Intervet International B.V., Niederlande	Vakzinierung von Ferkeln, one shot (Alter 3 Wochen) oder two shot (3.- 5. LT und 2- 3 Wochen später)
Porcilis[®] PCV ID(a)		Intradermale Vakzinierung ab einem Alter von 3 Wochen
Suvaxyn[®] PCV(a)	Zoetis Belgium S.A., B	Vakzinierung von Schweinen ab einem Alter von 3 Wochen

4.1. Passive Immunisierung gegen PCV2

Im Rahmen einer Untersuchung in Betrieben mit PMWS-Vorkommen finden CALSAMIGLIA et al. (2007) heraus, dass geringe Antikörpertiter gegen PCV2 bei Sauen mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate bei deren Nachkommen - vom Ferkel- bis ins Mastalter - im Zusammenhang stehen. Die Vakzination der Sauen zielt darauf ab, dass eine größere Menge von PCV2-IgG im Kolostrum vorhanden ist und somit eine geringere Anzahl von PCV2-virämischen Ferkeln auftritt (O'NEILL et al., 2012). Im Vergleich zu infizierten, ungeimpften Tieren ist bei infizierten, geimpften Tiere weniger PCV2 im Kolostrum vorhanden (GERBER et al., 2011).

Bei alleiniger Impfung der Sauen gegen PCV2 lässt sich eine

herabgesetzte Mortalität bei Ferkeln vor dem Absetzen erkennen (PEJSAK et al., 2010). Zudem zeigen KURMANN et al. (2011) im Rahmen einer Studie in der Schweiz, dass Ferkel von dreimalig (zweimal vor der Besamung und einmal während der Trächtigkeit) PCV2 vakzinieren Sauen zu allen Zeitpunkten der 6-maligen Probennahme postpartum höhere PCV2-Antikörperspiegel besitzen und außerdem während der kompletten Mastperiode signifikant höhere Tageszunahmen aufweisen. FRAILE et al. (2012) beobachten, dass Ferkel von einmalig vor dem Abferkeln PCV2 geimpften Sauen im Alter von vier Wochen hohe PCV2-Antikörpertiter aufweisen. Allerdings können bereits MCKEOWN et al. (2005) zeigen, dass es die Höhe der maternalen PCV2-Antikörper mit der Anzahl virämischer Tiere korreliert. Je geringer die Menge an maternalen Antikörpern gegen PCV2 ist, desto größer ist die Anzahl virämischer Tiere (MCKEOWN et al., 2005). In einer Untersuchung von EDDICKS et al. (2017) wird das Vorkommen von PCV2-Genotypen in Beständen mit unterschiedlichen Impfstrategien (aktive, passive und keine Immunisierung) untersucht. Dabei wird in Beständen mit aktiver Immunisierung zu keinem Zeitpunkt PCV2a, jedoch in 7 von 9 Beständen PCV2b nachgewiesen, weswegen ein möglicher selektiver Einfluss auf die Genotypen nur bei der aktiven Immunisierung vermutet wird (EDDICKS et al., 2017).

4.2. Aktive Immunisierung gegen PCV2

Im Rahmen eines Infektionsversuches nach zweimaliger Impfung von Ferkeln berichten FORT et al. (2008), dass die Impfung nachweisbar die PCV2-assoziierte Virämie reduziert und zusätzlich die Ausscheidung von PCV2 auf fäkalem und oralem Weg vermindert. Ähnliche Ergebnisse präsentieren auch OPRIESSNIG et al. (2008b) in ihrer Untersuchung von 2008, in der zudem noch eine Reduzierung der mit PCV2-assoziierten mikroskopischen Läsionen festgestellt wird.

Die hohe Wirksamkeit einer Ferkelimpfung zeigt sich im Rahmen einer in Süddeutschland durchgeführten Studie zu Erprobung eines Impfstoffes in einer Herde mit PMWS-assoziierten Problemen, wobei jeweils der Hälfte der Ferkel der Impfstoff oder ein Placebopräparat injiziert wird (KIXMÖLLER et al., 2008). Im Verlauf der Untersuchung kann

nachgewiesen werden, dass die geimpften Tiere im Gegensatz zu den Tieren aus der Kontrollgruppe beständig höhere Tageszunahmen, eine geringere Viruslast und eine im Durchschnitt ca. 30 Tage kürzere Dauer der Virämie aufweisen. Die ungeimpften Schweine zeigen im Alter von 10-26 Wochen eine 53 % höhere Mortalitätsrate sowie in der pathomorphologischen und pathohistologischen Untersuchung vermehrt die Symptome Kümern und Pneumonien (KIXMÖLLER et al., 2008).

HAAKE et al. (2014) vergleichen die Wirksamkeit einer PCV2-Impfung in Abhängigkeit vom Impfzeitpunkt in der ersten oder dritten Lebenswoche der Ferkel. Dabei wird gezeigt, dass im Vergleich mit der nicht vakzinierten Kontrollgruppe in der dritten Lebenswoche geimpfte Ferkel neben signifikant höheren Tageszunahmen bei PCV2-Infektion auch eine signifikant geringere Viruslast aufweisen (HAAKE et al., 2014). FRAILE et al. (2012) vermerken, dass eine im Ferkelalter geimpfte Partie zudem eine höhere Homogenität der Gewichte der schlachtreifen Schweine aufweist. Zudem kann gezeigt werden, dass durch das aktive Immunisieren der Ferkel im Vergleich zum Nichtimpfen ein geringerer Prozentsatz PCV2-positiver Tiere entsteht (FRAILE et al., 2012).

Im Zusammenhang mit der Impfung mit einer auf PCV2a basierenden Vakzine wird beim Vergleich aktiv immunisierter Tiere mit nicht gegen PCV2 immunisierten Tieren eine Verschiebung des Auftretens von PCV2a zu PCV2b beschrieben (SHEN et al., 2012; OPRIESSNIG et al., 2013b; OPRIESSNIG et al., 2013a). Auch SHEN et al. (2012) können im Rahmen ihrer Studie zeigen, dass nach Einführung der Impfung PCV2a nur in Proben aus Beständen ohne Impfung nachgewiesen werden kann, während PCV2b auch in Beständen mit Impfung zirkuliert. KEKARAINEN et al. (2014) hingegen können im Rahmen ihrer Studie beide Genotypen sowohl bei geimpften als auch ungeimpften Tieren nachweisen.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mittels verschiedener molekularbiologischer Analysen PCV2-DNA aus Blutproben aus Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz auf Genomebene zu untersuchen, um einen Überblick über das Vorkommen der Genotypen und Subcluster von PCV2 zu bekommen. Des Weiteren sollte der Einfluss des Impfstatus und der Länder auf das Vorkommen von Genotypen und Cluster der einzelnen Sequenzen betrachtet und analysiert werden. Es handelt sich um eine retrospektive Untersuchung von Serumproben, welche im Rahmen verschiedener Gesundheitsscreenings im Zeitraum von 2015 bis 2017 zur Untersuchung des Vorkommens von PCV2 in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz entnommen worden sind. Neben den molekularbiologischen Untersuchungen war es ein weiteres Ziel, die PCV2-Varianten genetisch zu charakterisieren. Dafür wurde das Vollgenom sequenziert und phylogenetisch analysiert.

Es sollen dabei folgenden Arbeitshypothesen überprüft werden:

1. Aufgrund des internationalen Handels mit Schweinen und aus Schweinen gewonnenen Produkten wird angenommen, dass zwischen deutschen und niederländischen PCV2-Isolaten eine hohe Sequenzidentität besteht, während mit den PCV2-Isolaten aus der Schweiz aufgrund der isolierten Handelslage des Landes eine geringere Sequenzidentität besteht.
2. Die Impfung mittels PCV2a-basierenden Impfstoffen hat einen selektiven Einfluss auf das Vorkommen von Genotypen, weswegen in Ferkelimpfbeständen ein vermehrtes Vorkommen von PCV2b erwartet wird.
3. In Seren mit dem Genotyp PCV2b oder PCV2d ist die Viruslast im Vergleich zu Seren mit PCV2a größer.

2. Bestandsinformationen

Insgesamt wurden 91 Bestände untersucht, wobei 59 in Deutschland, 20 in den Niederlanden und 12 in der Schweiz lagen.

Die deutschen Bestände waren in verschiedenen Bundesländern angesiedelt:



Abbildung 1: Verteilung der untersuchten Bestände nach Bundesländern in Deutschland (farbig ausgefüllt= mindestens ein untersuchter Bestand in diesem Bundesland; n=Anzahl der untersuchten Bestände in diesem Bundesland);

Quelle:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e3/Karte_Deutschland.svg.

Die niederländischen Proben stammten aus sieben verschiedenen Provinzen, wobei ein Bestand auch in Belgien lag:



Abbildung 2: Verteilung der untersuchten Bestände nach Provinzen in den Niederlanden (farbig ausgefüllt= mindestens ein untersuchter Bestand in dieser Provinz; n=Anzahl der untersuchten Bestände in dieser Provinz);

Quelle:

https://de.m.wikipedia.org/wiki/Datei:Netherlands_location_map.svg.

Die Schweizer Proben stammten aus 6 Schweizer Kantonen:



Abbildung 3: Verteilung der untersuchten Bestände nach Kantonen in der Schweiz (farbig ausgefüllt= mindestens ein untersuchter Bestand in diesem Kanton; n=Anzahl der untersuchten Bestände in diesem Kanton);

Quelle:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8c/Kanton_Wallis_auf_der_Schweizer_Karte.png.

Die Proben stammten aus 91 Beständen, wobei es sich bei 58 (63,7 %) Beständen um Ferkelimpfbestände und bei 7 (7,7 %) Beständen um Sauenimpfbestände handelte. In 17 (18,7 %) Beständen wurde nicht gegen PCV2 geimpft und in 9 (9,9 %) Beständen war der Impfstatus unbekannt. Die prozentuale Verteilung des Impfstatus aller untersuchten Bestände in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz ist Abbildung 4 zu entnehmen.

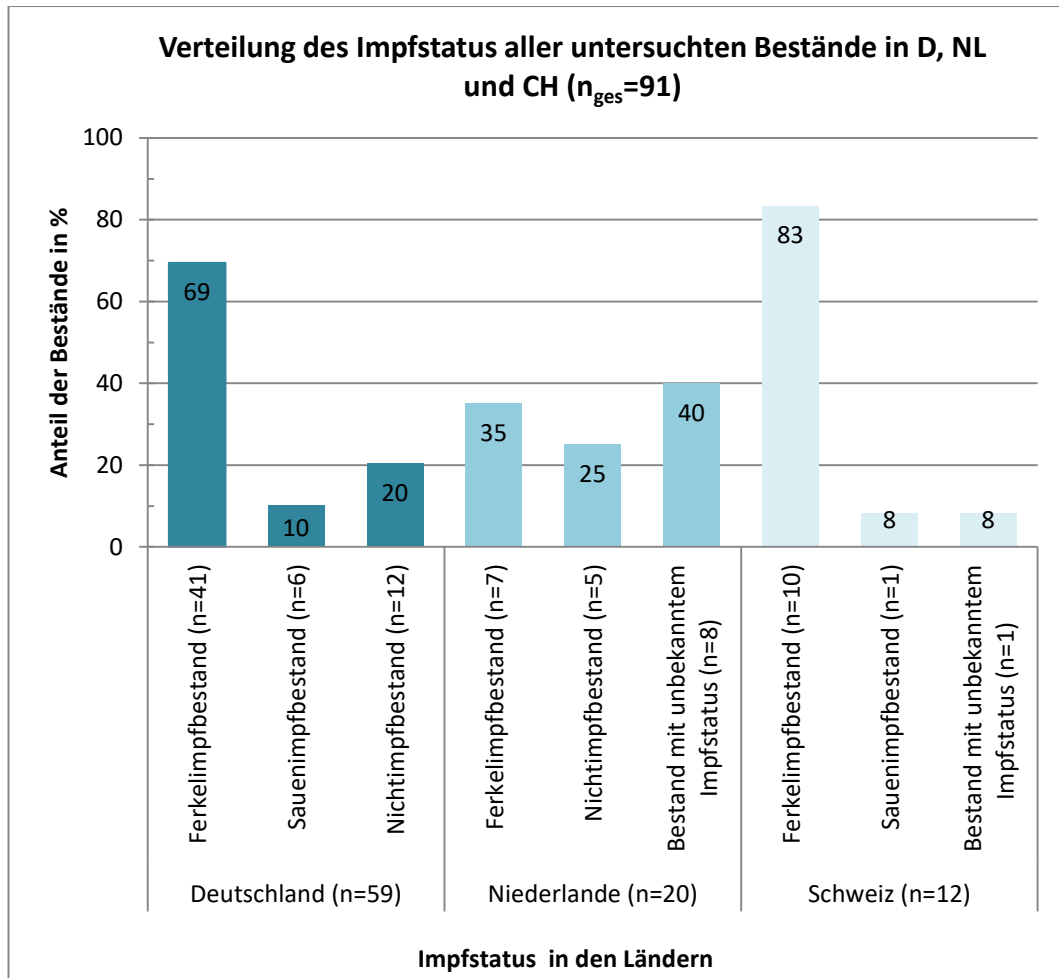


Abbildung 4: prozentuale Verteilung der verschiedenen Impfstatus der untersuchten Bestände in den einzelnen Ländern.

Werden die untersuchten Bestände nach der Betriebsform eingeteilt, arbeiteten insgesamt 35 von 91 (38,5 %) Bestände in einem geschlossenen System (Deutschland: 25, Niederlande: 8, Schweiz: 2), welches sowohl Ferkelproduktion als auch angeschlossene Mast beinhaltet. 52 von 91 (57,1 %) Beständen waren reine Mastbestände, wobei 34 in Deutschland, 8 in den Niederlanden und 10 in der Schweiz lagen. In 2 von 91 (2,2 %) Beständen wurde reine Ferkelerzeugung und in 2 von 91 (2,2 %) Beständen Jungsauvermehrung betrieben; diese 4 Bestände lagen in den Niederlanden.

3. Blutproben

Die 2102 Blutproben wurden zum einen im Rahmen des Diagnostik- und Monitoringsystems ResPig® der Firma MSD Animal Health in den Niederlanden (170 Proben in 20 Betrieben) genommen, zum anderen stammten sie aus der Schweiz aus verschiedenen Screening-Untersuchungen (257 Proben in 12 Betrieben). Die Seren aus Deutschland (1675 Proben aus 59 Betrieben) stammten aus einer zu diagnostischen Zwecken durchgeführten Screening-Untersuchung, bei der das Vorkommen infektiöser Atemwegserreger in deutschen Mastbeständen mit respiratorischen Anzeichen untersucht wurde. Alle Proben wurden zum Zweck der vorliegenden Studie zur Verfügung gestellt. Während in Deutschland und der Schweiz nur Mastschweine beprobt wurden, die in geschlossenen Systemen oder reinen Mastbetrieben aufgestellt waren, beinhalteten die niederländischen Proben zusätzlich Seren von Schweinen aus der Jungsauenvermehrung oder der Ferkelerzeugung. Eingeschlossen wurden Serumproben von Schweinen im Alter von 16 bis 24 Wochen, wobei deren Auswahl zufällig erfolgte. Von allen Proben lag bereits ein qPCR-Ergebnis vor, da sie bereits von der Research and Development Abteilung der Firma MSD Animal Health in Boxmeer, Niederlande, auf das Vorkommen von PCV2-DNA mittels quantitativer real-time-PCR getestet worden waren.

4. Fragebogen

Um genauere Informationen zu den Betrieben in den Niederlanden und der Schweiz zu erhalten, wurde an der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität ein Fragebogen erstellt.

Dieser wurde von den Ansprechpartnern aus den Niederlanden und der Schweiz ausgefüllt, soweit es Datenschutz und Kenntnis der erfragten Informationen zuließen (Fragebogen zum Bestand und ausgefüllte Originalfragebögen siehe im Anhang).

5. Amplifikation und Sequenzierung der PCV2-Isolate

Insgesamt wurden 136 Proben einer Vollgenom-Sequenzierung im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten für Tiere an der Klinik für Schweine der Justus-Liebig-Universität in Gießen unterzogen, wobei sich die Auswahl größtenteils an der Virusmenge orientierte, da die Qualität der Sequenzierungsergebnisse mit der Quantität der Viruslast in der Probe korreliert.

Um auch von Proben mit relativ geringer Viruslast PCV2-Genomsequenzen zu erhalten, wurde ein nested-PCR-Assay angewandt. Die primäre Amplifikation erzielte zwei 824bp (A, nn 21-844) und 1174bp (B, nn 682-87) lange Fragmente. Aus diesem Reaktionsansatz wurden jeweils direkt 1µl als Template für die nested-PCR verwendet, welche die Fragmente A_N (804bp, nn 30-833) und B_N (1137bp, nn 714-83) amplifizierte.

Für die PCR-Reaktion wurde das Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Bei den PCR-Reaktionen A, A_N und B wurden 10 µl Ansätze verwendet: 5 µl 2x Multiplex Mastermix, 1 µl Auftragspuffer*, 2 µl Wasser, 1 µl DNA und 1 µl des jeweiligen Primermix (4µM Primermix, 0,4µM Endkonzentration im Ansatz). Die PCR-Reaktion B_N wurde mit 20 µl Volumen durchgeführt (gleiches Verhältnis der Bestandteile).

*Auftragspuffer: 0,3 g Orange G, 25 g Saccharose, ad 100 ml mit aq. bidest.

Es wurde der in Tabelle 3 angegebene Primermix verwendet.

Tabelle 3: verwendeter Primermix.

	1. PCR	nested-PCR
Abschnitt A	PCV2AF/PCV2AR	PCV2A _N F/PCV2A _N R
Abschnitt B	PCV2BF/PCV2BR	PCV2B _N F/PCV2B _N R

In Tabelle 4 sind die Primer dargestellt, die zur Amplifikation und Sequenzierung verwendet wurden.

Tabelle 4: Primer zur Amplifikation und Sequenzierung.

Primername	Sequenz (5'-3')	Position (PCV2a AF264042)
PCV2 AF	GCA GCA CCT CGG CAG CAC CTC	21-41
PCV2 AR	GAG GAG TAC CAT TCC AAC GGG GTC TG	819-844
PCV2 A _N F	CGG CAG CAC CTC AGC AGC AAC	30-50
PCV2 A _N R	TTC CAA CGG GGT CTG ATT GCT GG	811-833
PCV2 BF	TGG TKG TTA TTG ATG ACT TTT ATG G	682-706
PCV2 BR	GTT GGG GTC CGC TTC TTC	70-87
PCV2 B _N F	CCS TGG GAT GAT CTA CTG AGA CT	714-736
PCV2 B _N R	GGG TCC GCT TCT TCC ATT C	65-83
PCV2 B _N F2*	AAR TAN CGG GAG TGG TAG GAG AA	1254-1276

*nur für Sequenzierung verwendet

Es wurde das in Tabelle 5 dargestellte Temperaturprotokoll angewandt.

Tabelle 5: Darstellung des angewandten Temperaturprotokolls.

	Polymerase-aktivierung	Wiederholungen: A 20x, A _N 35x, B 35x, B _N 35x			Finale Elongation
		Denaturierung	Annealing	Elongation	
A	95°C, 15 min	95°C, 30 sec	62°C, 90 sec	72°C, 60 sec	72°C, 10 min
A_N			64°C, 90 sec		
B			61°C, 90 sec		
B_N			64°C, 90 sec		

Als Sequenzierungsprimer wurden für Abschnitt A_N PCV2 A_NR und für Abschnitt B_N PCV2B_NF und PCV2B_NF2 verwendet.

Eine Auftragssequenzierung nach Sanger (SANGER et al., 1977) erfolgte bei LGC Genomics (Berlin).

6. Phylogenetische Analyse

Das Assembling der erhaltenen Genomfragmente erfolgte am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten für Tiere an der Klinik für Schweine der Justus-Liebig-Universität in Gießen mithilfe der Programme BioEdit® Sequence Alignment Editor (Department of Molecular Biology, North Carolina State University) und Microsoft Excel® (2010, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Die Annotation der ORFs wurde mithilfe des Lasergene-Softwarepakets EditSeq® der Firma DNASTAR an der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt (DNASTAR®, Inc., Madison, USA).

Die phylogenetische Analysen wurden an der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität und am Lehrstuhl für Virologie des Instituts für Infektionskrankheiten und Zoonosen der Tierärztlichen

Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität mithilfe der Software „MEGA7“ (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tempe, Arizona, USA) durchgeführt. Phylogenetische Stammbäume basierend auf dem Vollgenom oder der ORF2-Sequenz wurden nach Alignment mit CLUSTAL W (EMBL-EBI, The European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK) mittels Neighbor-Joining Algorithmus (p-distance Modell, 1000 bootstraps) am Lehrstuhl für Virologie des Instituts für Infektionskrankheiten und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät der LMU München erstellt. Die Genotypisierung bzw. Subtypisierung erfolgte anhand von Referenz-PCV2-Sequenzen, welche von der NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, Maryland, USA) bezogen wurden am Lehrstuhl für Virologie des Instituts für Infektionskrankheiten und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät der LMU München.

7. Statistische Auswertung

Die statistische Datenauswertung erfolgte mithilfe der Programme IBM SPSS Statistics® (Version 23.0, IBM® SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und Microsoft Excel® (2010, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Für die qualitative Auswertung der Seren wurde jeder einzelne Bestand als statistische Einheit betrachtet. Für die quantitative Auswertung der Seren wurde jedes Einzeltier als statistische Einheit betrachtet. Das Signifikanzniveau der Untersuchung lag bei 5% ($p = 0,05$) mit einem Konfidenzintervall von 95%. Als Grundlage der quantitativen Auswertung dienten die errechneten Mediane, sowie 1. und 3. Quartil. Eine Prüfung dieser Daten auf Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov-Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors. Mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests wurde versucht, Unterschiede in der Höhe der zu vergleichenden Mediane der Variable Genomkopien / ml Serum in Abhängigkeit von den Gruppierungsvariablen (Impfstatus und Länder) aufzuzeigen. Wurde ein p -Wert $< 0,05$ errechnet, wurden die Mediane mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Bei mehr als zwei Testgruppen wurden diese einzeln gegeneinander getestet. Die so errechneten p -Werte wurden nach Bonferroni-Holm korrigiert.

Um zu ermitteln, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen den bestandsspezifischen Faktoren (=unabhängige Variablen) und den detektierten Genotypen und Clustern (=abhängige Variablen) bestand, wurden Kreuztabellen und Chi-Quadrat-Test nach Pearson verwendet. Dabei wurde untersucht, ob der Standort oder der Impfstatus der Schweine, von denen die untersuchten Proben stammten, einen signifikanten Einfluss auf das Vorkommen bestimmter Genotypen und Cluster auf Bestands- und Einzeltierebene haben. In Tabelle 6 sind die Definitionen der unabhängigen Variablen aufgeführt. Bei den abhängigen Variablen „Genotyp“ und „Cluster“ wurden nur die vorliegenden sequenzierten Vollgenome berücksichtigt.

Tabelle 6: Definition der zur statistischen Analyse verwendeten unabhängigen und abhängigen Variablen.

Unabhängige Variablen	Definition
Land	1 = Deutschland
	2 = Niederlande
	3 = Schweiz
Impfstatus	1 = Ferkelimpfbestand
	2 = Sauenimpfbestand
	3 = Nichtimpfbestand
	4 = unbekannter Impfstatus
Abhängige Variablen	Definition
Quantitative PCR (qPCR)	0 = negativ
	1 = positiv
Genotyp	1 = PCV2a
	2 = PCV2b
	3 = PCV2d
Cluster	1 = 2a-2D
	2 = 2b-1A
	3 = 2b-1B
	4 = 2d-2

IV. ERGEBNISSE

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchung auf Bestandsebene dargelegt. Aus insgesamt 91 Beständen lagen 2102 Serumproben vor.

1. Auswertung der Ergebnisse auf Bestandsebene

1.1. Molekularbiologische Untersuchungen der Serumproben

Insgesamt konnte in 53,8 % (49/91) aller in die Untersuchung eingeschlossener Bestände in mindestens einer Probe mittels PCV2-spezifischer real-time PCR PCV2-DNA detektiert werden.

1.1.1. Qualitative Auswertung von PCV2-Genom auf Bestandsebene in Abhängigkeit vom Standort

In folgendem Kapitel wird der PCV2-Status der Bestände im Zusammenhang mit ihrem Standort in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz näher betrachtet. Hierbei zeigte sich, dass die niederländischen Bestände signifikant häufiger PCV2-positiv waren als die Bestände in Deutschland oder der Schweiz ($p < 0,05$).

Abbildung 5 stellt das Vorkommen von PCV2 bei Beständen in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz graphisch dar.

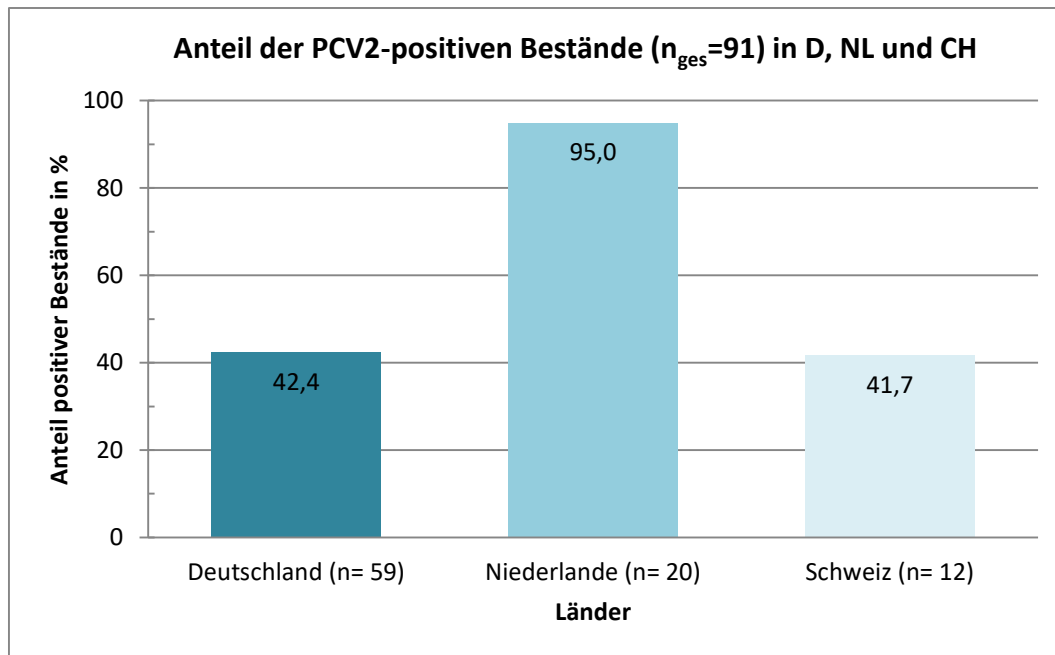


Abbildung 5: Prozentualer Anteil der PCV2-positiv getesteten Bestände in Abhängigkeit von deren Standort in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz.

1.1.2. Qualitative Auswertung von PCV2-Genom auf Bestandsebene in Abhängigkeit vom Impfstatus

In Abbildung 6 werden die Ergebnisse der Untersuchung der Bestände im Hinblick auf den Impfstatus dargelegt. Dabei wurden 9 Bestände, deren Impfstatus unbekannt war, von der Analyse ausgeschlossen.

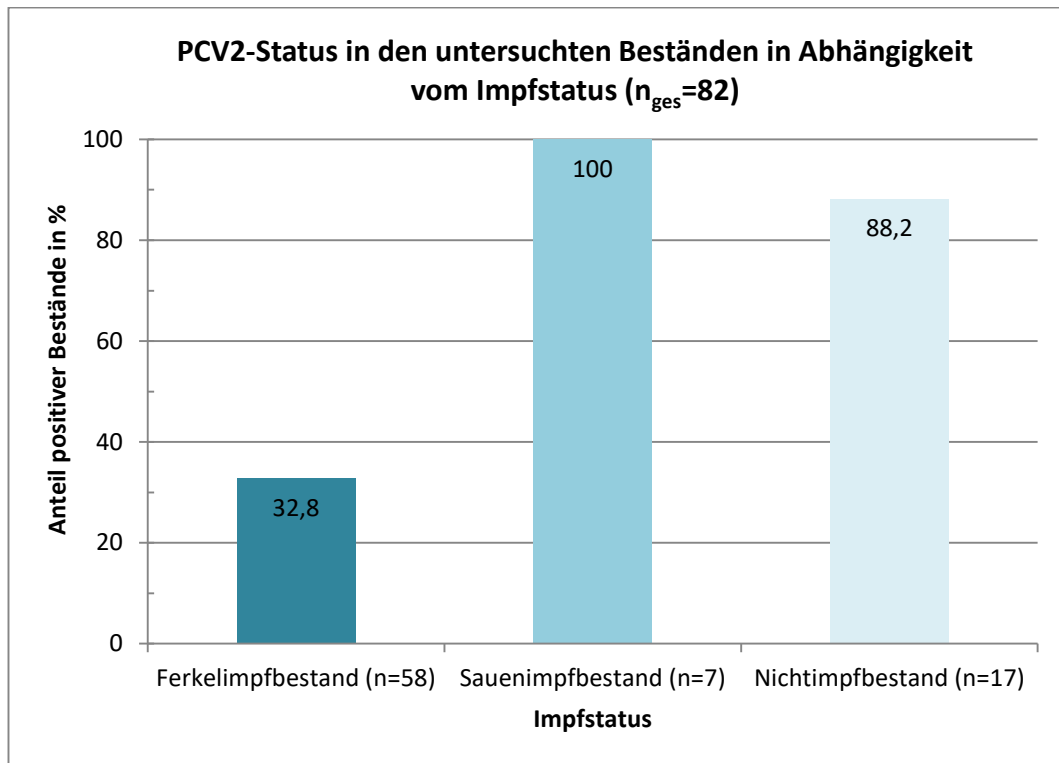


Abbildung 6: prozentualer Anteil der PCV2-positiv getesteten Bestände in Abhängigkeit von deren Impfstatus als Ferkelimpfbestand, Sauenimpfbestand oder Nichtimpfbestand.

Der statistische Vergleich der drei Impfgruppen untereinander zeigte, dass Sauenimpfbestände und Nichtimpfbestände signifikant häufiger PCV2-positiv waren als Ferkelimpfbestände ($p_{SF}=0,001$; $p_{NF}\leq 0,001$).

1.2. Vorkommen der PCV2-Genotypen und PCV2-Cluster auf Bestandsebene

In 47 von insgesamt 49 PCV2-positiven Beständen, aus denen Proben einer Genotypisierung unterzogen wurden, konnten drei verschiedene Genotypen des porcinen Circovirus Typ 2, PCV2a, PCV2b und PCV2d detektiert werden. In 43 Beständen kam es zum Auftreten von Monoinfektionen, in 4 Beständen konnten zwei verschiedene Genotypen

zum gleichen Zeitpunkt detektiert werden. So wurde in zwei Beständen gleichzeitig PCV2a und PCV2b und in zwei Beständen gleichzeitig PCV2b und PCV2d nachgewiesen.

In Abbildung 7 ist die prozentuale Verteilung des Vorkommens der PCV2-Genotypen auf Bestandsebene dargestellt.

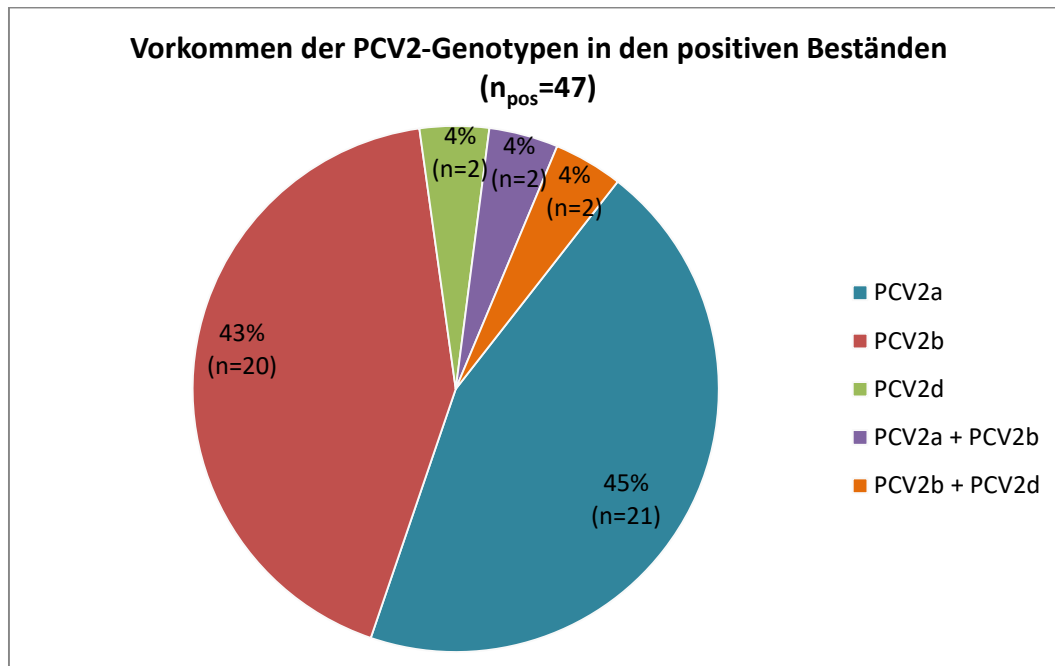


Abbildung 7: prozentuale Verteilung der detektierten PCV2-Genotypen in allen positiven Beständen, aus denen genotypisierte Proben vorlagen.

1.2.1. Genotypen und Cluster in den Beständen in Abhängigkeit vom Standort

Von 136 Vollgenomsequenzen aus insgesamt 47 PCV2-positiven Beständen, deren Genotypen und Cluster im Rahmen der Sequenzierung bestimmt wurden, stammten 86 Sequenzen aus 24 deutschen Beständen, 38 Sequenzen aus 18 niederländischen Beständen und 12 Sequenzen aus 5 schweizerischen Beständen.

Tabelle 7 zeigt die Verteilung der Genotypen und Cluster sowie das gleichzeitige Vorkommen mehrerer Genotypen und Cluster in den Beständen der drei Länder im Vergleich.

Tabelle 7: Verteilung der PCV2-Genotypen und Cluster in den untersuchten PCV2-positiven Beständen mit genotypisierten Proben ($n_{\text{pos}}=47$) in Abhängigkeit von der Probenherkunft aus Deutschland (D), den Niederlanden (NL) und der Schweiz (CH).

Genotypenvorkommen					
Clustervorkommen					
	PCV2a	PCV2b	PCV2d	PCV2a + PCV2b	PCV2b + PCV2d
D	50 %	33,3 %	4,2 %	4,2 %	8,3 %
(n=24)	(12/24)	(8/24)	(1/24)	(1/24)	(2/24)
	PCV2a-2D	4x PCV2b-1A 4x PCV2b-1B	PCV2d-2	PCV2a-2D + PCV2b-1B	PCV2b-1A + PCV2d-2
NL	22,2 %	66,7 %	5,6 %	5,6 %	0 %
(n=18)	(4/18)	(12/18)	(1/18)	(1/18)	
	PCV2a-2D	7x PCV2b-1A 4x PCV2b-1B 1x PCV2b-1A + PCV2b-1B	PCV2d-2	PCV2a-2D + PCV2b-1B	
CH	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
(n=5)	(5/5)				
	PCV2a-2D				

Die statistischen Auswertungen ergaben, dass zwischen dem Vorkommen der Genotypen und deren Verteilung in den einzelnen Ländern keine signifikanten Assoziationen bestanden ($p > 0,05$).

1.2.2. Genotypen und Cluster in den Beständen in Abhängigkeit vom Impfstatus

Von 47 Beständen, aus denen mindestens ein Vollgenom sequenziert werden konnte, führten 18 eine aktive Immunisierung der Ferkel durch, 6 eine passive Immunisierung und 15 waren Nichtimpfbestände. Von den restlichen 8 Beständen war kein Impfstatus bekannt, somit wurden diese in der folgenden Auswertung nicht berücksichtigt. Tabelle 8 zeigt die Verteilung der Genotypen und Cluster sowie das gleichzeitige Vorkommen mehrerer Genotypen und Cluster in den Beständen in Abhängigkeit von der Art der Immunisierung der Ferkel in den Beständen.

Tabelle 8: Verteilung der PCV2-Genotypen und Cluster in den untersuchten PCV2-positiven Beständen mit genotypisierten Proben ($n_{\text{pos}}=47$) in Abhängigkeit vom jeweiligen Impfstatus als Ferkelimpfbestand (FI), Sauenimpfbestand (SI) oder Nichtimpfbestand (NI).

Genotypenvorkommen					
Clustervorkommen					
	PCV2a	PCV2b	PCV2d	PCV2a + PCV2b	PCV2b + PCV2d
FI	38,9 %	38,9 %	11,1 %	5,6 %	5,6 %
(n=18)	(7/18)	(7/18)	(2/18)	(1/18)	(1/18)
	PCV2a-2D	2x PCV2b-1A 5x PCV2b-1B	2x PCV2d	PCV2a-2D + PCV2b-1B	PCV2b-1A + PCV2d-2
SI	83,3 %	0 %	0 %	16,7 %	0 %
(n=6)	(5/6)			(1/6)	
	PCV2a-2D			PCV2a-2D + PCV2b-1B	
NI	33,3 %	60,0 %	0 %	0 %	6,7 %
(n=15)	(5/15)	(9/15)			(1/15)
	PCV2a-2D	5x PCV2b-1A 3x PCV2b-1B 1x PCV2b-1A + PCV2b-1B			PCV2b-1A + PCV2d-2

Zwischen dem Auftreten der Genotypen und den Impfstatus der Betriebe konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden ($p>0,05$).

2. Auswertung der Ergebnisse auf Einzeltierebene

Von den 2102 untersuchten Einzelproben waren 84,5 % (1777/2102) PCV2-DNA negativ. In 15,5 % (325/2102) der Proben konnte mittels real-time PCR PCV2-DNA nachgewiesen werden. Davon stammten 216 Seren aus Deutschland, 97 aus den Niederlanden und 12 aus der Schweiz. Daraus konnten 136 Vollgenomsequenzen erstellt werden, wobei 8 Sequenzen nicht eindeutig einem Genotypen zugeordnet werden konnten und somit aus den folgenden Analysen ausgeschlossen wurden.

2.1. Molekularbiologische Untersuchung von PCV2-Genom aller PCV2-positiven Proben

Bei den 325 PCV2-positiven Einzelproben wurde im Median ein PCV2-DNA-Gehalt im Serum von $2,43 \times 10^4$ (Q1: $5,36 \times 10^3$, Q3: $8,89 \times 10^4$) Genomkopien pro ml Blutserum nachgewiesen. Der statistische Vergleich der DNA-Gehalte in Genomkopien / ml Serum zwischen den einzelnen Ländern oder hinsichtlich der Impfstatus ergab keine signifikanten Assoziationen ($p > 0,05$).

Um die Menge der in der qPCR detektierten PCV2-DNA in den untersuchten Proben quantitativ vergleichen zu können, wurden die Einzeltielergebnisse nach Wertebereichen geordnet. Dazu wurden die Werte (Genomkopien / ml) einer Zehnerpotenz einer Kategorie zugeordnet. In die Kategorie „ 10^3 “ fallen z. B. alle Werte zwischen 1000-9999. Insgesamt ergaben sich somit 8 Gruppen ($10^2 - 10^9$ Genomkopien / ml Serum). Abbildung 8 stellt die Verteilung der 325 positiven Einzelseren auf die 8 Wertebereiche dar. Um die Verteilung der positiven Einzelseren abhängig vom Impfstatus darstellen zu können, wurden 37 Seren, deren Impfstatus unbekannt war, aus der folgenden Analyse ausgeschlossen. Abbildung 9 zeigt die Verteilung der positiven Seren in Abhängigkeit vom Impfstatus (aktive Immunisierung, passive Immunisierung oder Nichtimpfen im Bestand).

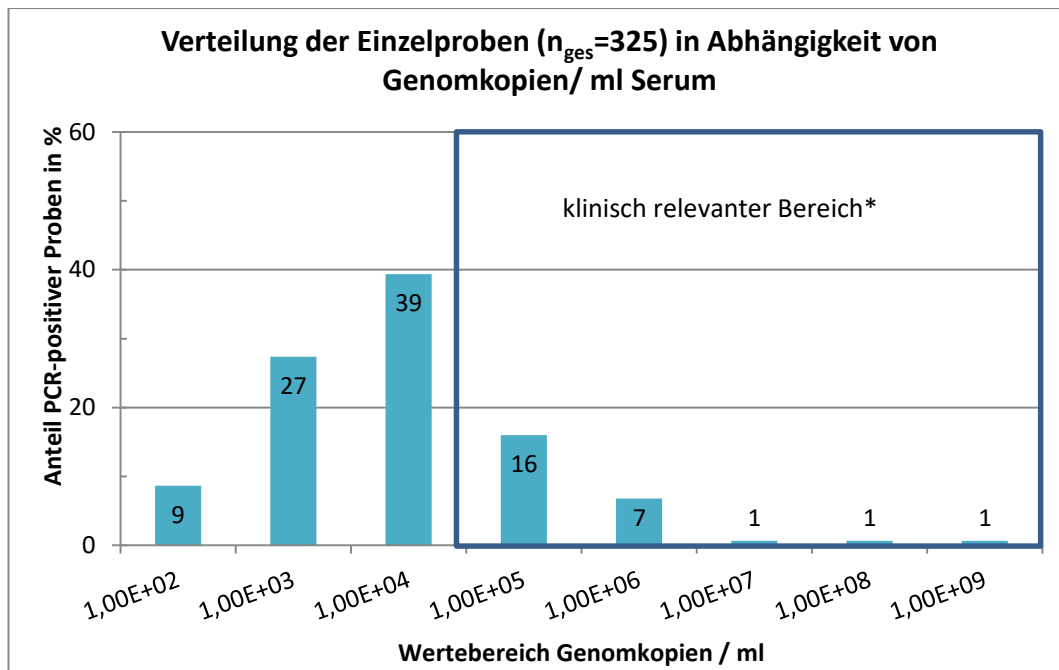


Abbildung 8: prozentualer Anteil aller PCV2-positiven Proben pro Wertebereich in Genomkopien / ml Serum (*klinisch relevanter Bereich nach BRUNBORG et al. (2004); OLVERA et al. (2004); HARDING et al. (2008)).

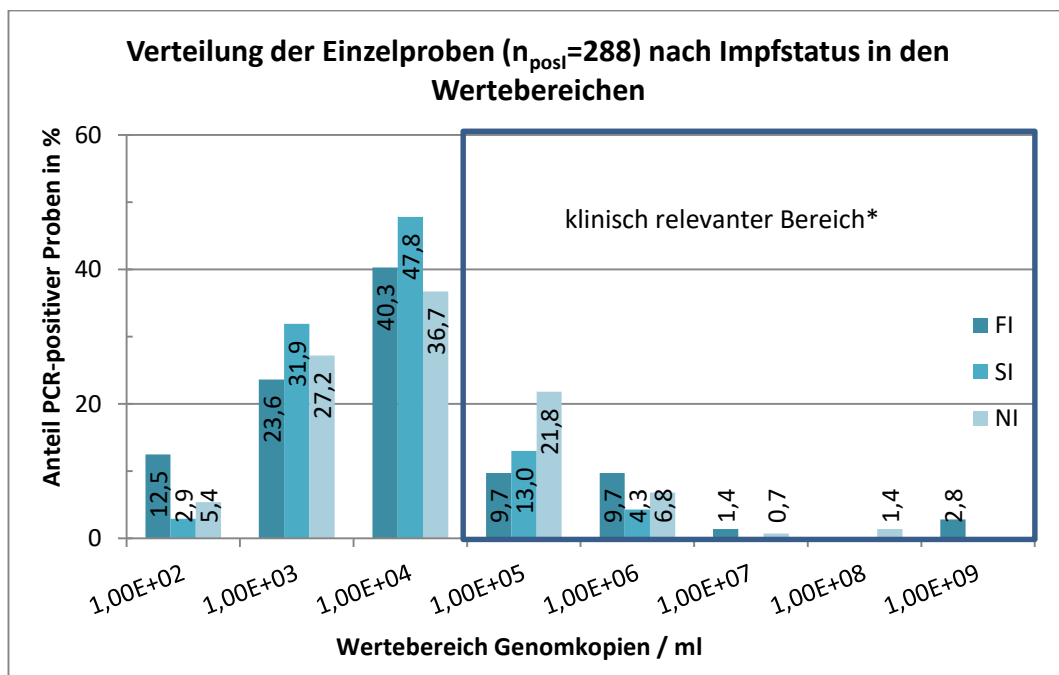


Abbildung 9: prozentuale Verteilung der PCV2-positiven Proben nach Impfstatus als Ferkelimpfbestand (FI), Sauenimpfbestand (SI) oder Nichtimpfbestand (NI) pro Wertebereich in Genomkopien / ml Serum (*klinisch relevanter Bereich nach BRUNBORG et al. (2004); OLVERA et al. (2004); HARDING et al. (2008)).

Die Werte der 128 Vollgenome in Genomkopien / ml wurden ebenfalls in Wertebereiche eingeteilt. In Abbildung 10 sind die prozentualen Anteile der PCV2-Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d nach Wertebereichen geordnet dargestellt.

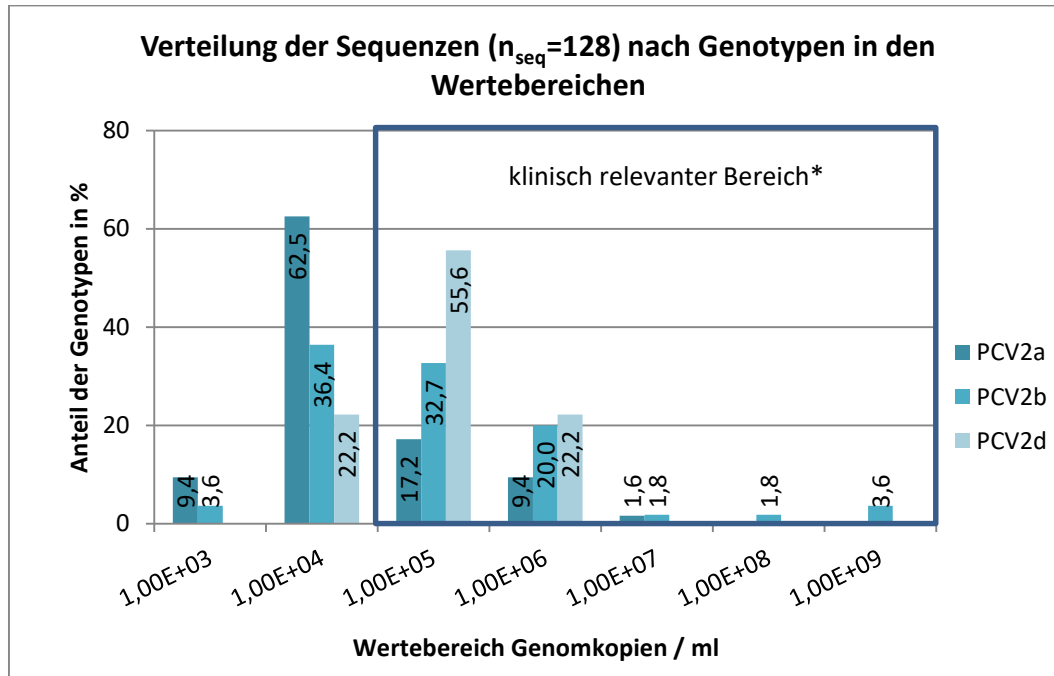


Abbildung 10: prozentualer Anteil der Genotypen aller sequenzierten Proben pro Wertebereich in Genomkopien / ml Serum (*klinisch relevanter Bereich nach BRUNBORG et al. (2004); OLVERA et al. (2004); HARDING et al. (2008)).

2.2. Auswertung der Vollgenomsequenzen

Von den insgesamt 128 Vollgenomsequenzen gehörten 64 dem Genotyp PCV2a, 55 dem Genotyp PCV2b und 9 dem Genotyp PCV2d an. Durch phylogenetische Analyse der Cluster wurden 64 dem Cluster PCV2a-2D zugeordnet, 34 dem Cluster PCV2b-1A, 21 dem Cluster PCV2b-1B und 9 dem Cluster PCV2d-2.

Bei allen 128 Vollgenomsequenzen konnte im Median $5,85 \times 10^4$ (Q1: $2,25 \times 10^4$, Q3: $6,69 \times 10^5$) Genomkopien von PCV2 pro ml Blutserum nachgewiesen werden. In den Proben aus Deutschland wurde ein PCV2-Gehalt von DNA pro ml Serum von $4,62 \times 10^4$ (Q1: $2,06 \times 10^4$, Q3: $4,04 \times 10^5$) im Median detektiert, in den Proben aus den Niederlanden von $6,65 \times 10^5$ (Q1: $5,43 \times 10^4$, Q3: $3,04 \times 10^6$) Genomkopien / ml Serum und in den Proben aus der Schweiz von $2,50 \times 10^4$ (Q1: $1,66 \times 10^4$, Q3: $6,62 \times 10^4$)

Genomkopien / ml Serum. Der statistische Vergleich dieser Werte innerhalb der Länder ergab einen signifikanten Zusammenhang ($p < 0,05$). Beim Vergleich der Proben aus den einzelnen Ländern konnte festgestellt werden, dass in den Niederlanden sowohl im Vergleich zu Deutschland ($p < 0,001$) als auch im Vergleich zur Schweiz ($p = 0,001$) im Median ein signifikant höherer PCV2-Gehalt von DNA im Serum nachzuweisen war.

Im Zusammenhang mit dem Impfstatus ergab sich bei den Proben aus Ferkelimpfbeständen im Median ein PCV2-DNA-Gehalt von $4,95 \times 10^4$ (Q1: $1,97 \times 10^4$, Q3: $2,12 \times 10^6$) Genomkopien / ml Serum, bei den Proben aus Sauenimpfbeständen von $2,52 \times 10^4$ (Q1: $1,55 \times 10^4$, Q3: $5,29 \times 10^4$) Genomkopien / ml Serum und bei den Proben aus Nichtimpfbeständen von $2,38 \times 10^5$ (Q1: $3,48 \times 10^4$, Q3: $7,16 \times 10^5$) Genomkopien / ml Serum im Median. Der statistische Vergleich dieser Werte zeigte, dass Proben aus Nichtimpfbeständen im Vergleich mit Proben aus Sauenimpfbeständen einen signifikant höheren Gehalt an PCV2-DNA im Serum im Median aufwiesen ($p = 0,001$).

2.2.1. Vergleichende quantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse der verschiedenen Genotypen

Unabhängig von anderen Einflussfaktoren wurde im Folgenden der durchschnittliche Gehalt von PCV2-DNA im Serum im Zusammenhang mit den drei im Rahmen der Untersuchung detektierten Genotypen untersucht. In den Seren, aus denen im späteren Verlauf der Untersuchung die Vollgenome sequenziert wurden, die dem Genotyp PCV2a angehörten, konnte ein Gehalt von PCV2-DNA im Serum von $3,86 \times 10^4$ (Q1: $1,69 \times 10^4$, Q3: $1,19 \times 10^5$) Genomkopien / ml Serum im Median detektiert werden. Basierend auf der späteren Vollgenomsequenzierung zeigten Seren mit Genotyp PCV2b im Median einen PCV2-DNA-Gehalt von $4,03 \times 10^5$ (Q1: $3,68 \times 10^4$, Q3: $2,35 \times 10^6$) Genomkopien / ml Serum. In den Seren mit Genotyp PCV2d wurden im Median $4,87 \times 10^5$ (Q1: $1,24 \times 10^5$, Q3: $1,04 \times 10^6$) Genomkopien / ml Serum nachgewiesen. Der statistische Vergleich der drei Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d hinsichtlich dieser Werte zeigte, dass in Seren, deren Vollgenome im Rahmen der Sequenzierung dem Genotypen PCV2b oder PCV2d zugeordnet wurden, im Vergleich zu PCV2a

signifikant mehr Genomkopien / ml Serum enthalten sind ($p_{\text{PCV2b}} < 0,001$; $p_{\text{PCV2d}} = 0,006$). Beim Vergleich der Genotypen PCV2b und PCV2d gab es dahingehend keinen signifikanten Zusammenhang ($p > 0,05$).

2.2.2. Vergleichende quantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse der verschiedenen Genotypen hinsichtlich Länderzugehörigkeit und Impfstatus

In Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz und ebenso in Abhängigkeit vom jeweiligen Impfstatus ließen sich je nach Genotyp mittels qPCR unterschiedliche Gehalte an Genomkopien / ml im Median in den Einzelseren detektieren. Diese sind in Tabelle 9 und in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 9: Darstellung der mittleren Gehalte an PCV2-DNA in Genomkopien / ml Serum in den Einzelseren, aufgeteilt nach Genotypen in Deutschland (D), den Niederlanden (NL) und der Schweiz (CH).

		Med	Q1	Q3
D	PCV2a (n=46)	$3,86 \times 10^4$	$1,64 \times 10^4$	$1,16 \times 10^5$
	PCV2b (n=28)	$9,21 \times 10^4$	$2,71 \times 10^4$	$6,28 \times 10^5$
	PCV2d (n=8)	$3,63 \times 10^5$	$9,98 \times 10^4$	$8,06 \times 10^5$
NL*	PCV2a (n=6)	$1,81 \times 10^5$	$3,53 \times 10^4$	$4,56 \times 10^6$
	PCV2b (n=27)	$7,29 \times 10^5$	$5,61 \times 10^4$	$3,40 \times 10^6$
CH	PCV2a (n=12)	$2,50 \times 10^4$	$1,66 \times 10^4$	$6,62 \times 10^4$

*Eine Berechnung des mittleren Gehalts an DNA-Kopien / ml Serum war in den Niederlanden aufgrund der geringen Anzahl des Genotypen PCV2d (n=1; PCV2-DNA-Gehalt: $2,12 \times 10^6$ Genomkopien / ml Serum) nicht möglich. In der Schweiz konnten die Genotypen PCV2b und PCV2d nicht detektiert werden.

Tabelle 10: Darstellung der mittleren Gehalte an PCV2-DNA in Genomkopien / ml Serum in den Einzelproben, aufgeteilt nach Genotypen und Impfstatus als Ferkelimpfbestand (FI), Sauenimpfbestand (SI) oder Nichtimpfbestand (NI).

		Med	Q1	Q3
FI	PCV2a (n=13)	$7,18 \times 10^4$	$1,45 \times 10^4$	$1,76 \times 10^6$
	PCV2b (n=15)	$4,06 \times 10^4$	$2,56 \times 10^4$	$3,40 \times 10^6$
	PCV2d (n=3)	$7,60 \times 10^4$	$2,02 \times 10^4$	n.a.
SI*	PCV2a (n=19)	$2,07 \times 10^4$	$1,55 \times 10^4$	$4,47 \times 10^4$
NI	PCV2a (n=27)	$4,29 \times 10^4$	$2,15 \times 10^4$	$1,20 \times 10^5$
	PCV2b (n=32)	$4,19 \times 10^5$	$8,22 \times 10^4$	$1,40 \times 10^6$
	PCV2d (n=6)	$4,88 \times 10^5$	$2,21 \times 10^5$	$9,74 \times 10^5$

*Eine Berechnung des mittleren Gehalts an DNA-Kopien / ml Serum war bei Proben aus Sauenimpfbeständen aufgrund der geringen vorhandenen Anzahl des Genotypen PCV2b (n=1; PCV2-DNA-Gehalt: $8,93 \times 10^6$ Genomkopien / ml Serum) nicht möglich. Der Genotyp PCV2d konnte bei den Sauenimpfbeständen nicht detektiert werden.

2.2.3. Vergleichende quantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse der verschiedenen Cluster hinsichtlich Länderzugehörigkeit und Impfstatus

In Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz und ebenso in Abhängigkeit vom jeweiligen Impfstatus ließen sich je nach Cluster mittels qPCR unterschiedliche Gehalte an Genomkopien / ml im Median in den Einzelseren detektieren. Diese sind in Tabelle 11 und Tabelle 12

dargestellt.

Tabelle 11: Darstellung der mittleren Gehalte an PCV2-DNA in Genomkopien / ml Serum in den Einzelseren, aufgeteilt nach Clustern in Deutschland (D), den Niederlanden (NL) und der Schweiz (CH).

		Med	Q1	Q3
D	PCV2a-2D (n=46)	$3,86 \times 10^4$	$1,64 \times 10^4$	$1,16 \times 10^5$
	PCV2b-1A (n=20)	$2,67 \times 10^5$	$4,19 \times 10^4$	$7,00 \times 10^5$
	PCV2b-1B (n=8)	$3,12 \times 10^4$	$1,78 \times 10^4$	$4,64 \times 10^4$
	PCV2d-2 (n=8)	$3,63 \times 10^5$	$9,98 \times 10^4$	$8,06 \times 10^5$
NL*	PCV2a-2D (n=6)	$1,81 \times 10^5$	$3,53 \times 10^4$	$4,56 \times 10^6$
	PCV2b-1A (n=14)	$3,56 \times 10^5$	$3,96 \times 10^4$	$2,51 \times 10^6$
	PCV2b-1B (n=13)	$2,35 \times 10^6$	$4,31 \times 10^5$	$1,42 \times 10^8$
CH	PCV2a-2D (n=12)	$2,50 \times 10^4$	$1,66 \times 10^4$	$6,62 \times 10^4$

*Eine Berechnung des mittleren Gehalts an DNA-Kopien / ml Serum war in den Niederlanden aufgrund der geringen Anzahl des Clusters PCV2d-2 (n=1; PCV2-DNA-Gehalt: $2,12 \times 10^6$) nicht möglich. In der Schweiz konnten keine anderen Cluster detektiert werden.

Tabelle 12: Darstellung der mittleren Gehalte an PCV2-DNA in Genomkopien / ml Serum in den Einzelproben, aufgeteilt nach Clustern und Impfstatus als Ferkelimpfbestand (FI), Sauenimpfbestand (SI) oder Nichtimpfbestand (NI).

		Med	Q1	Q3
FI	PCV2a-2D (n=13)	$7,18 \times 10^4$	$1,45 \times 10^4$	$1,76 \times 10^6$
	PCV2b-1A (n=5)	$3,66 \times 10^4$	$4,24 \times 10^3$	$3,77 \times 10^5$
	PCV2b-1B (n=10)	$3,25 \times 10^5$	$2,65 \times 10^4$	$3,03 \times 10^8$
	PCV2d-2 (n=3)	$7,60 \times 10^4$	$2,02 \times 10^4$	n.a.
SI*	PCV2a-2D (n=19)	$2,07 \times 10^4$	$1,55 \times 10^4$	$4,47 \times 10^4$
NI	PCV2a-2D (n=27)	$4,29 \times 10^4$	$2,15 \times 10^4$	$1,20 \times 10^5$
	PCV2b-1A (n=26)	$4,19 \times 10^5$	$1,02 \times 10^5$	$1,80 \times 10^6$
	PCV2b-1B (n=6)	$4,31 \times 10^5$	$3,07 \times 10^4$	$6,96 \times 10^7$
	PCV2d-2 (n=6)	$4,88 \times 10^5$	$2,21 \times 10^5$	$9,74 \times 10^5$

*Eine Berechnung des mittleren Gehalts an DNA-Kopien / ml Serum war bei Proben aus Sauenimpfbeständen aufgrund der geringen Anzahl des Clusters PCV2b-1B (n=1; PCV2-DNA-Gehalt: $8,93 \times 10^6$) nicht möglich.

2.2.4. Vorkommen von Genotypen und Clustern in den Einzeleren im Zusammenhang mit dem Standort in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz

Von den 128 analysierten Vollgenomsequenzen stammten 82 aus Deutschland, 34 aus den Niederlanden und 12 aus der Schweiz. Die Verteilung der im Rahmen der Untersuchung detektierten PCV2-Genotypen in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz ist Abbildung 11 zu entnehmen.

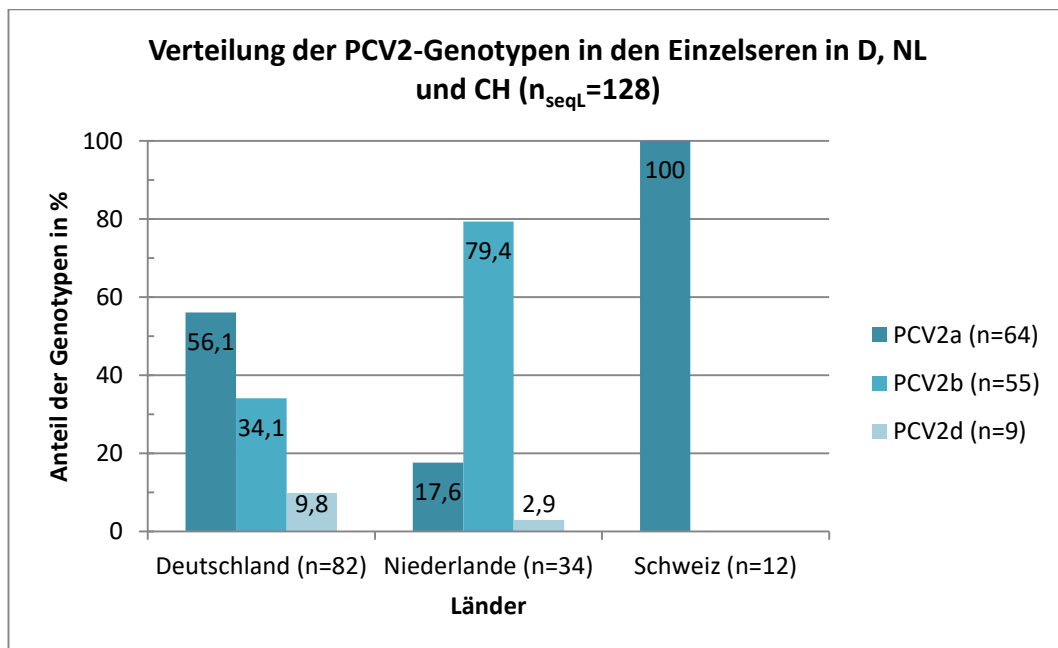


Abbildung 11: prozentuale Anteile der PCV2-Genotypen in den sequenzierten Einzeleren in Abhängigkeit von deren Herkunft aus Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz.

Die statistische Auswertung der Verteilung der in der Untersuchung nachgewiesenen PCV2-Genotypen in Abhängigkeit von ihrem Standort in Deutschland, den Niederlanden oder der Schweiz ergab, dass Genotyp PCV2a im Vergleich zu anderen Genotypen signifikant häufiger in Deutschland nachzuweisen war als in den Niederlanden ($p \leq 0,001$). Im Vergleich mit den beiden anderen Ländern war Genotyp PCV2a signifikant häufiger in der Schweiz nachzuweisen ($p < 0,05$). PCV2b war signifikant häufiger in den Niederlanden zu finden als in Deutschland ($p \leq 0,001$). Bezüglich des Genotypen PCV2d konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge in Abhängigkeit vom Standort festgestellt

werden ($p>0,05$).

Bei PCV2a konnte nur der Cluster PCV2a-2D und bei PCV2d nur der Cluster PCV2d-2 nachgewiesen werden. Bei Genotyp PCV2b konnten mit PCV2b-1A und PCV2b-1B zwei verschiedene Cluster nachgewiesen werden. Die prozentuale Verteilung der Cluster bei den Vollgenomsequenzen in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz kann Abbildung 12 entnommen werden.

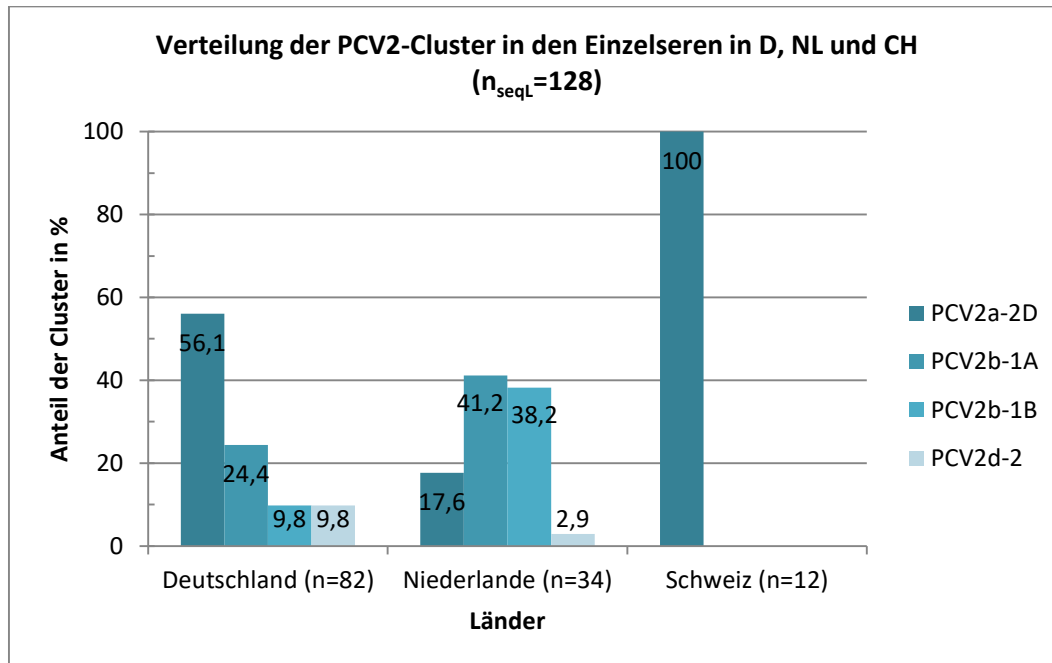


Abbildung 12: prozentuale Anteile der PCV2-Cluster in den sequenzierten Einzelseren in Abhängigkeit von deren Herkunft aus Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz.

Zwischen der Verteilung der Cluster und deren Länderzugehörigkeit ließ sich ein signifikanter Zusammenhang erkennen ($p<0,05$). Beim Vergleich der einzelnen Cluster konnte festgestellt werden, dass PCV2a-2D in der Schweiz signifikant häufiger auftrat, als in Deutschland ($p=0,003$) und in den Niederlanden ($p\leq 0,001$). Zudem konnte in Deutschland im Vergleich zu den Niederlanden signifikant häufiger PCV2a-2D nachgewiesen werden ($p\leq 0,001$). Der Cluster PCV2b-1B ist in den Niederlanden signifikant häufiger als in Deutschland ($p\leq 0,001$) zu finden. Hinsichtlich Cluster PCV2d-2 ergaben sich keine signifikanten Assoziationen mit dem Auftreten in den Ländern ($p>0,05$).

2.2.5. Vorkommen von Genotypen und Clustern in den Einzeleren im Zusammenhang mit dem Impfstatus

Von 128 vorhandenen Vollgenomen stammten 24,2 % (31/128) der Sequenzen aus Ferkel impfenden Beständen, 15,6 % (20/128) aus Sauen impfenden Beständen und 50,8 % (65/128) aus nicht impfenden Beständen. Bei 9,4 % (12/128) der Sequenzen war der Impfstatus unbekannt, weswegen diese von der Analyse ausgeschlossen wurden. In Abbildung 13 ist das Vorkommen der Genotypen in Abhängigkeit vom jeweiligen Impfstatus dargestellt:

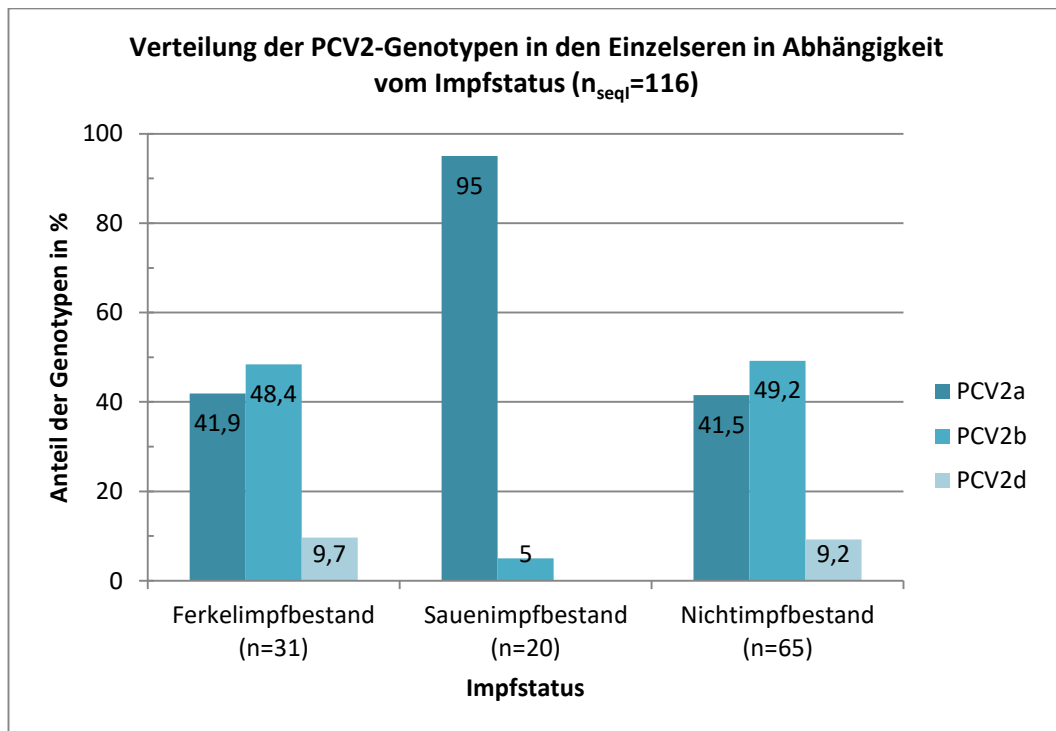


Abbildung 13: prozentuale Anteile der PCV2-Genotypen in den sequenzierten Einzeleren in Abhängigkeit von deren Impfstatus als Ferkelimpfbestand, Sauenimpfbestand und Nichtimpfbestand.

Die statistische Auswertung der Verteilung der in der Untersuchung nachgewiesenen PCV2-Genotypen in Abhängigkeit von ihrem Impfstatus ergab, dass bei Vollgenomsequenzen aus Sauenimpfbeständen im Vergleich mit Ferkelimpfbeständen und Nichtimpfbeständen signifikant häufiger PCV2a nachgewiesen wurde ($p_{\text{SFa}} \leq 0,001$; $p_{\text{SNa}} \leq 0,001$). Im Vergleich mit Sauenimpfbeständen konnte sowohl bei Ferkelimpfbeständen als auch bei Nichtimpfbeständen signifikant mehr PCV2b detektiert werden ($p_{\text{SFb}} = 0,001$; $p_{\text{SNb}} \leq 0,001$). Hinsichtlich des

Genotypen PCV2d konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge in Abhängigkeit vom Impfstatus festgestellt werden ($p > 0,05$).

Alle Vollgenomsequenzen, die dem Genotypen PCV2a angehörten, wurden dem Cluster PCV2a-2D zugeordnet. Von den 116 untersuchten Vollgenomsequenzen wurden mit Bezug auf den Impfstatus 41,9 % der (13/31) Sequenzen aus Ferkelimpfbeständen, 95,0 % (19/20) der Sequenzen aus Sauenimpfbeständen und 41,5 % (27/65) der Sequenzen aus Nichtimpfbeständen dem Cluster PCV2a-2D zugeordnet. Bei Genotyp PCV2d wurde nur der Cluster PCV2d-2 gefunden, wobei bei 9,7 % (3/31) der Sequenzen mit Ferkelimpfung, bei keiner Sequenz mit Sauenimpfung und bei 9,2 % (6/65) der Nichtimpfsequenzen dieser Cluster nachgewiesen wurde.

Bei Genotyp PCV2b erfolgte eine Einteilung in die Cluster PCV2b-1A und PCV2b-1B. Bei den Ferkelimpfbeständen gehörten 16,1 % (5/31) der Sequenzen dem Cluster PCV2b-1A und 32,3 % (10/31) dem Cluster PCV2b-1B an. Bei den Sauenimpfbeständen war bei 5,0 % (1/20) der Sequenzen PCV2b-1B nachzuweisen. Bei den Sequenzen aus Nichtimpfbeständen waren 40 % (26/65) dem Cluster PCV2b-1A und 9,2 % (6/65) dem Cluster PCV2b-1B zuzuordnen.

Der χ^2 -Test nach Pearson ($n=116$) ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Impfstatus und dem Vorkommen der Cluster von PCV2 ($p < 0,05$). Dabei stellte sich heraus, dass in Sauenimpfbeständen signifikant häufiger im Vergleich zu Ferkel- und Nichtimpfbeständen der Cluster PCV2a-2D gefunden wurde ($p \leq 0,001$). Hinsichtlich des Clusters PCV2b-1A konnte in Nichtimpfbeständen signifikant häufiger PCV2b-1A detektiert werden als in Ferkelimpfbeständen ($p = 0,019$) und in Sauenimpfbeständen ($p = 0,001$). Sowohl im Vergleich mit Sauenimpfbeständen ($p = 0,034$) als auch mit Nichtimpfbeständen ($p = 0,005$) konnte PCV2b-1B signifikant häufiger in Ferkelimpfbeständen nachgewiesen werden. Bezüglich des Clusters PCV2d-2 konnten im Zusammenhang mit dem Impfstatus keine signifikanten Assoziationen dargestellt werden ($p > 0,05$).

2.3. Phylogenetische Stammbäume

In Abbildung 14, 15 und 16 sind die phylogenetischen Stammbäume, die mittels Neighbor-Joining Algorithmus basierend auf den Vollgenomsequenzen und den ORF2 erstellt wurden, dargestellt. Mithilfe guter bootstraps-values konnte eine eindeutige Zuordnung der Sequenzen erfolgen. Insgesamt konnten von 136 vorhandenen Vollgenomsequenzen 128 Sequenzen verwendet werden, da 8 Sequenzen ausgeschlossen wurden. Davon zählten 64 Sequenzen zu PCV2a, 55 Sequenzen zu PCV2b und 9 Sequenzen zu PCV2d. Durch den Vergleich mit Referenzstämmen wurden die 64 PCV2a-Sequenzen dem Cluster PCV2a-2D zugeordnet. Sequenzen des Genotyps PCV2b waren den Clustern PCV2b-1A und PCV2b-1B zuzuordnen. Zum Cluster 1A gehörten 34 Sequenzen, zum Cluster 1B 21 Sequenzen. Die 9 PCV2d Sequenzen konnten alle dem Cluster PCV2d-2 zugeordnet werden.

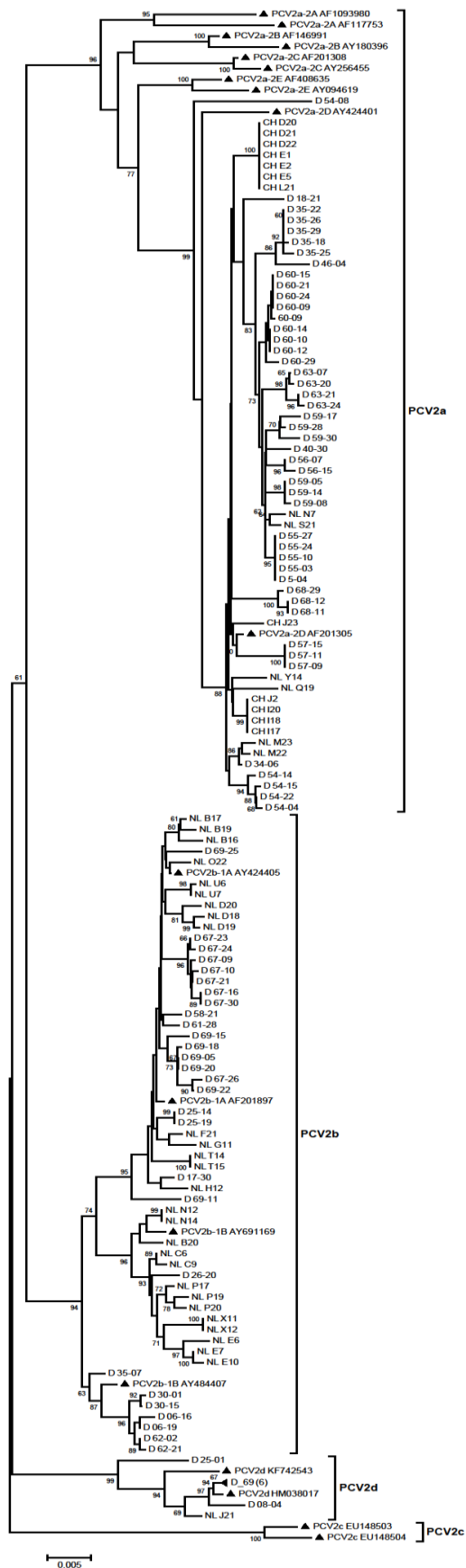


Abbildung 14: phylogenetischer Stammbaum basierend auf dem Vollgenom der PCV2-Isolate (Neighbor-Joining-Methode, p-distance-Modell, 1000 bootstraps).

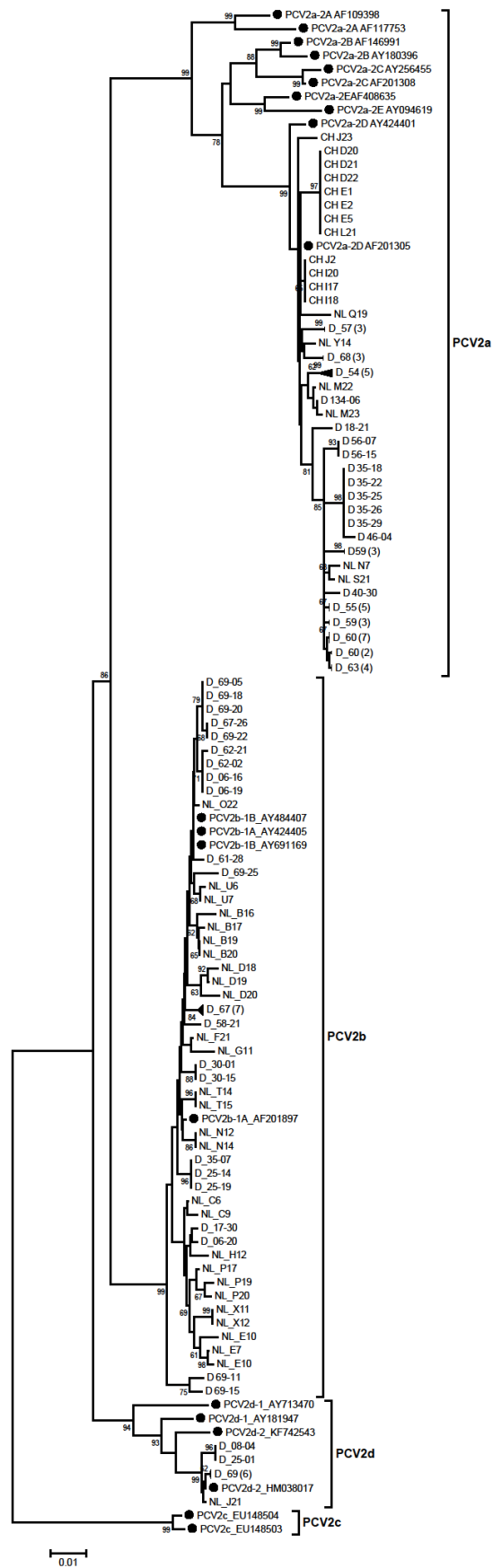


Abbildung 15: phylogenetischer Stammbaum basierend auf dem ORF2 der PCV2-Isolate (Neighbor-Joining-Methode, p-distance-Modell, 1000 bootstraps).

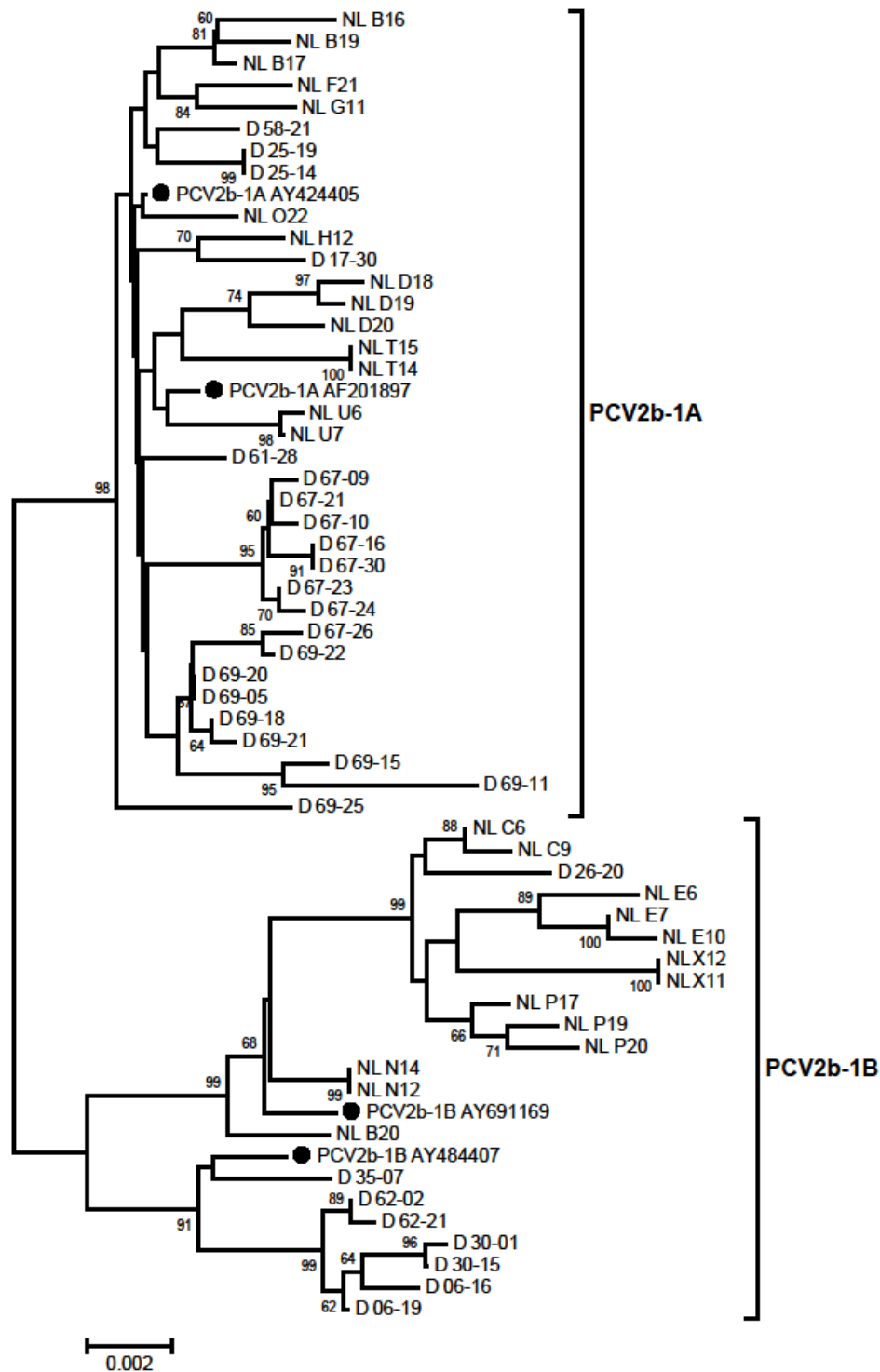


Abbildung 16: Subtypisierung von PCV2b-Isolaten mittels phylogenetischer Analyse (Neighbor-Joining-Methode, p-distance-Modell, 1000 bootstraps) des Vollgenoms.

V. DISKUSSION

1. Ergebnisse auf Bestandsebene

1.1. Vorkommen PCV2-positiver Bestände

Im Rahmen der vorliegenden Studie war in 53,8 % aller untersuchten Bestände mindestens eine Serumprobe PCV2-DNA positiv. Diese Aussage deckt sich zum Teil mit der nach SEGALÉS et al. (2007) weltweit ubiquitären Verbreitung von PCV2 in der Hausschweinpopulation. Seine Aussage stützt sich jedoch auf die Detektion von PCV2-Antikörpern (SEGALÉS et al., 2007), während in der eigenen Studie PCV2-DNA im Serum untersucht wurde. Das Ergebnis der eigenen Untersuchungen stimmte allerdings nicht mit den Ergebnissen der Studie von REINER et al. (2010) überein, bei der sich 98,8 % der beprobten Schweine (das durchschnittliche Gewicht bei der Schlachtung betrug 32,4 kg) mittels qPCR als PCV2-positiv erwiesen. Im Gegensatz zu der eigenen Studie wurden dabei allerdings Gewebeproben (Lymphknoten, Tonsillen, Lunge, Milz) verwendet, welche im Rahmen einer Routinediagnostik genommen wurden. Eine mögliche Erklärung für den in der eigenen Studie vorliegenden hohen Anteil an PCV2-positiven Beständen könnte dabei sein, dass sich PCV2 auch trotz Massenvakzination nicht vollständig aus den Beständen entfernen lässt (FENG et al., 2014). Allerdings wird die Viruslast und Prävalenz des Virus in den Beständen nachweislich durch die Impfung gesenkt (DVORAK et al., 2016). Auch KIXMÖLLER et al. (2008) und FACHINGER et al. (2008) beschreiben im Rahmen ihrer Studie eine Verringerung der Viruslast und eine Verkürzung der Dauer der Virämie bei geimpften Tieren. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der eigenen Studie, da in 46,2 % der Bestände kein Nachweis von PCV2-DNA stattfand. Ein anderer Grund für die eigenen Ergebnisse könnte möglicherweise das Alter der Schweine sein, deren Seren in die Untersuchung miteinbezogen wurden (16.-24. Lebenswoche). Laut HARDING (2004) tritt die klinische PMWS-Symptomatik typischerweise bei einem Alter von 7 bis 15 Wochen auf. RITZMANN et al. (2002) hingegen kamen im Rahmen ihrer 156 bayerischen Bestände

beinhaltenden Studie zu dem Schluss, dass der Anteil PCV2-positiver Tiere mit zunehmendem Alter steigt. Auch SZIKORA (2015) konnte in der Endmast die höchste Anzahl virämischer Tiere nachweisen. Ebenso können HAAKE et al. (2014) und OH et al. (2014) zeigen, dass das Virus vor allem in der Mittel- und Endmast gefunden wird. In der eigenen Studie wurden gezielt Seren von Schweinen im Alter von 16 bis 24 Wochen ausgewählt, um die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von PCV2-Virämien bei Schweinen zu erhöhen. Durch die vorliegenden Ergebnisse können die Ergebnisse der anderen Studien bestätigt werden. Eine andere mögliche Ursache für das Vorkommen von PCV2 in über der Hälfte der untersuchten Bestände könnte der internationale Handel mit subklinisch infizierten Schweinen (FRANZO et al., 2015c) oder infiziertem Sperma (SCHMOLL et al., 2008) sein. Auch MENG (2012) konnte zeigen, dass PCV2 sich sowohl durch den direkten Kontakt mit infizierten Tieren als auch über infektiöses Sperma verbreitet. Während zwischen Deutschland und den Niederlanden ein intensiver Handel mit Schweinen und Schweineprodukten (Deutschland ist der wichtigste Abnehmer niederländischer Ferkel (ISN, 2017)) stattfindet, befindet sich die Schweiz in einer isolierten Lage hinsichtlich des Handels mit Schweinen und Schweineprodukten. In 7 von 12 Beständen, aus denen Proben bezogen wurden, wurde die künstliche Besamung mit Sperma der schweizerischen Dienstleistungs-AG SUISAG® durchgeführt, lediglich in einem davon wurde zusätzlich Sperma aus der Bretagne verwendet.

In der eigenen Studie erwiesen sich Sauenimpfbestände und Nichtimpfbestände als signifikant häufiger PCV2-positiv als Ferkelimpfbestände. Auch FRAILE et al. (2012) konnten zeigen, dass durch das Impfen der Ferkel im Vergleich zum Nichtimpfen ein geringerer Prozentsatz PCV2-positiver Ferkel entsteht. Die Senkung der Viruslast durch die wirksame Ferkelimpfung, wie sie FACHINGER et al. (2008) oder KIXMÖLLER et al. (2008) beschreiben, könnte ein Grund dafür sein, warum Nichtimpfbestände und Sauenimpfbestände im Vergleich zu Ferkelimpfbeständen häufiger PCV2-positiv sind. Ein anderer Grund für die vorliegenden Ergebnisse könnte der länger anhaltende und bessere Impfschutz der Ferkel durch die aktive Immunisierung im Vergleich mit der passiven Immunisierung sein. OH et

al. (2014) konnten im Rahmen ihrer Studie beim Vergleich verschiedener Impfstoffe und Impfschemata zeigen, dass bei allen drei Impfstoffen eine Ferkelimpfung allein im Vergleich zur Sauenimpfung allein die Virämie signifikant verringerte. Während die passive Immunisierung die Ferkel nur bis zu einem Alter von acht (OPRIESSNIG et al., 2010) oder neun (CHAE, 2012) Lebenswochen vor einer PCV2-Infektion schützt, bewirkt die aktive Immunisierung bei den Ferkeln bis zur 34. Lebenswoche eine stabile Antikörperreaktion auf eine Infektion mit PCV2 (MARTELLI et al., 2016).

1.2. PCV2 Genotypen und Cluster in den Beständen

In verschiedenen asiatischen Ländern und den USA wird derzeit am häufigsten PCV2d nachgewiesen, weshalb dieser Genotyp dort als dominierend gilt (XIAO et al., 2016; THANGTHAMNIYOM et al., 2017; QU et al., 2018). Im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnten lediglich in insgesamt 8 % (4 % Monoinfektion und 4 % Mischinfektion mit PCV2b) aller untersuchten Bestände entweder PCV2d als Monoinfektion oder zugleich mit PCV2b nachgewiesen wurde. Diese abweichenden eigenen Ergebnisse könnten möglicherweise damit erklärt werden, dass in den Studien von XIAO et al. (2016) und QU et al. (2018) PCV2d in Proben von meist klinisch auffälligen Tieren nachgewiesen wurde, während in den eigenen Untersuchungen Serumproben von Schweinen unabhängig von anderen Faktoren wie Impfstatus oder klinischer Erkrankung als Grundlage dienten. Wie schon erwähnt, wurden nicht alle PCV2-positiven Proben einer Genotypisierung unterzogen, da die Qualität der Sequenzierungsergebnisse mit der Quantität der Viruslast in der Probe korreliert.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wiesen 45 % der Bestände den Genotypen PCV2a, 43 % den Genotypen PCV2b und 4 % beide Genotypen zum gleichen Zeitpunkt auf. In anderen Studien in Großbritannien (GRIERSON et al., 2018) und Italien (FRANZO et al., 2015c) wurde PCV2b als dominierender Genotyp beschrieben. Auch REINER et al. (2015) wiesen im Rahmen ihrer diagnostischen Studie in Deutschland 52 von 62 Sequenzen dem Genotypen PCV2b zu, lediglich eine Sequenz wurde als mPCV2b (=PCV2d) klassifiziert, die restlichen

Sequenzen als PCV2a. In der eigenen Studie hingegen erschien das Vorkommen von PCV2a und PCV2b annähernd gleich. In anderen Studien wird diskutiert, ob das Auftreten von Genotypen durch die passive oder aktive Immunisierung beeinflusst werden könnte (SHEN et al., 2012; XIAO et al., 2012; OPRIESSNIG et al., 2013b; REINER et al., 2015; FRANZO et al., 2016). Zu diesem Schluss kamen auch REINER et al. (2015), da sie im Rahmen ihrer Studie zeigen konnten, dass 89 % aller detektierten PCV2a-Sequenzen aus nicht geimpften Herden stammten (REINER et al., 2015). Die PCV2b-Sequenzen stammten hingegen zu 52 % aus geimpften Beständen (REINER et al., 2015). Auch in einer Studie zum Vorkommen von PCV2 aus den USA, die fünf Jahre nach Einführung der Impfung gegen PCV2 durchgeführt wurde, konnte PCV2a nur in Proben aus Nichtimpfbeständen nachgewiesen werden, während PCV2b auch in Impfbeständen detektiert wurde (SHEN et al., 2012). Ebenso wurde auch in einer Studie zum Vorkommen von Genotypen in Beständen mit unterschiedlichen Impfstrategien in Deutschland die Vermutung aufgestellt, dass die Ferkelimpfung einen selektiven Einfluss auf das Vorkommen der Genotypen hat, nicht jedoch die Sauenimpfung (EDDICKS et al., 2017). Verschiedene Autoren sehen den Genotypenshift von PCV2a zu PCV2b sogar als mögliche Konsequenz der PCV2-Impfung an (XIAO et al., 2012; OPRIESSNIG et al., 2013b; OPRIESSNIG et al., 2013a). In der eigenen Studie war jedoch sowohl das Genotypenvorkommen von PCV2a und PCV2b annähernd gleich, als auch die Anzahl der nicht impfenden und impfenden Bestände. Deswegen können die Ergebnisse anderer Autoren durch die eigenen Ergebnisse nicht bestätigt werden.

2. Ergebnisse auf Einzeltierebene

2.1. Auswertung der molekularbiologischen Untersuchungen der Einzeltiere

In der vorliegenden Studie konnte in Seren, die dem Genotypen PCV2b oder PCV2d zugeordnet wurden, im Vergleich zu Seren, die dem Genotypen PCV2a angehörten, signifikant mehr Genomkopien / ml Serum nachgewiesen werden. Auch REINER et al. (2015) beschreiben bei PCV2b eine höhere Viruslast als bei PCV2a, genauso wie EDDICKS et al. (2017). In Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl zwischen der im Blut (HARDING et al., 2008) als auch zwischen der im Gewebe infizierter Schweine (BRUNBORG et al., 2004) nachgewiesenen Virusmenge und dem Schweregrad der Erkrankung ein signifikanter Zusammenhang besteht. Auch BAUMGARTNER et al. (2012) konnten zeigen, dass klinisch an PMWS-erkrankte Schweine signifikant höhere Gehalte an PCV2-DNA im Serum aufwiesen als gesunde Tiere aus Kontrollbeständen. Dies könnte möglicherweise daran liegen, dass PCV2b und auch PCV2d höhere Virämien verursachen als PCV2a und deswegen eine höhere Virulenz besitzen. Das könnte auch ein möglicher Grund sein, warum PCV2d häufig im Zusammenhang mit klinisch auffälligen Schweinen detektiert wurde (XIAO et al., 2016; QU et al., 2018). Es muss erwähnt werden, dass in der eigenen Untersuchung die Korrelation zwischen Genotypen und Genomkopien / ml Serum möglicherweise durch die Auswahl der Proben zur Sequenzierung mit Gehalten ab 10^4 Genomkopien PCV2-DNA / ml Serum mitunter beeinflusst wurde.

In den eigenen Untersuchungen wurde zudem herausgefunden, dass Serumproben aus Nichtimpfbeständen eine signifikant höhere Viruslast im Gegensatz zu Sauenimpfbeständen aufwiesen. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien. So konnten OPRIESSNIG et al. (2017) im Rahmen ihrer experimentellen Studie eine Verringerung der Viruslast bei geimpften und mit PCV2d inokulierten Schweinen im Gegensatz zu ungeimpften inokulierten Tieren nachweisen. Auch FACHINGER et al. (2008) stellten fest, dass eine aktive Immunisierung der Ferkel die Viruslast signifikant verringert, genauso

wie KIXMÖLLER et al. (2008), die die Ferkelimpfung einer PMWS-betroffenen Herde mit einer Placebogruppe verglichen. DIAS et al. (2013) untersuchten das Vorkommen von PCV2 bei Beständen, die Jungsauen gegen PCV2 impften im Vergleich mit Beständen mit ungeimpften Sauen. Dabei kamen sie zu dem Schluss, dass eine Impfung einen positiven Effekt auf die Verringerung der Virämie bei Muttersauen und die Infektion der Ferkel hat (DIAS et al., 2013).

Beim Vergleich der Werte der Viruslast in den Einzelproben aus den verschiedenen Ländern konnte gezeigt werden, dass Proben aus den Niederlanden im Vergleich mit Deutschland und der Schweiz einen signifikant höheren PCV2-DNA-Gehalt aufweisen. Dies könnte an der Probenauswahl liegen, da die Qualität der Sequenzierungsergebnisse mit der Quantität der Viruslast in der Probe korreliert. In der eigenen Untersuchung wurden größtenteils Proben zur Sequenzierung mit Gehalten ab 10^4 Genomkopien PCV2-DNA / ml Serum ausgewählt, um möglichst vollständige Vollgenomsequenzen zu erhalten.

Eine andere mögliche Ursache könnte sein, dass in den Niederlanden eventuell mehr Betriebe am ResPig[®]-Programm teilgenommen haben, die vermehrt Probleme aufzuweisen haben. Auch Koinfektionen können die Viruslast erhöhen (SINHA et al., 2011). Da allerdings sowohl Informationen zu möglichen vorhandenen Koinfektionen als auch zu erhöhter Problematik in Beständen in den Niederlanden fehlen, kann ein Zusammenhang damit nur vermutet werden.

2.2. Auftreten von Genotyp und Cluster in Abhängigkeit von Land und Impfstatus

In den 12 PCV2-positiven Seren aus der Schweiz konnte nur der Genotyp PCV2a mit dem Cluster PCV2a-2D nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse widersprechen der Aussage von WIEDERKEHR et al. (2009), die in der Schweiz eine Dominanz des Genotypen PCV2b beschreiben. Außerdem stammen alle vorhandenen schweizerischen Sequenzen aus Beständen, in denen Schweine entweder aktiv oder passiv gegen PCV2 immunisiert wurden, was der Annahme einiger Autoren widerspricht, die den Genotypenshift als Konsequenz der PCV2-Impfung ansehen (XIAO et al., 2012; OPRIESSNIG et al., 2013b; OPRIESSNIG et al., 2013a; REINER

et al., 2015). Ein möglicher Grund für den Nachweis von PCV2a als einzigen Genotypen in der Schweiz könnte die isolierte Lage der Schweiz hinsichtlich des Imports von Schweinen und Schweineprodukten sein. JAGANATHAN et al. (2011) kommen, basierend auf phylogenetischen Analysen, zu dem Schluss, dass durch den Import von Zuchtschweinen ein Eintrag von PCV2 in das jeweilige Land möglich ist. In der Schweiz ist die Gefahr eines Eintrags eher gering, da die Mastschweine zum Teil in geschlossenen Systemen gehalten werden. Außerdem stammen die Ferkel, die zur reinen Masthaltung verwendet werden oder zur Aufstallung in Zuchtbeständen bestimmt sind, überwiegend aus dem nationalen Handel. Demzufolge könnte der geringere Tierverkehr eine mögliche Erklärung dafür sein, warum in den schweizerischen Seren nur der Genotyp PCV2a nachgewiesen werden konnte. Auch die Transporthygiene könnte eine Rolle für das alleinige Vorkommen des Genotypen PCV2a und dem des Clusters PCV2a-2D in der Schweiz spielen. Da PCV2 zu den unbehüllten DNA-Viren (TISCHER et al., 1982) gehört und gegenüber verschiedenen Reinigungs- und Desinfektionsmechanismen eine hohe Stabilität aufweist (SHIBATA et al., 2003) könnte in der Schweiz durch hohe Anforderungen an die Transporthygiene die Verbreitung der PCV2-Genotypen eingedämmt werden. Im Gegensatz zu anderen Studien (XIAO et al., 2016; QU et al., 2018) wurden in die eigene Studie nicht ausschließlich diagnostische Proben miteingeschlossen. Allerdings handelte es sich um eine geringe Anzahl von Vollgenomsequenzen aus der Schweiz, weswegen ein Auftreten des Genotyps in Zusammenhang mit der Herkunft der Probe aus der Schweiz vorsichtig betrachtet werden muss.

In den eigenen Untersuchungen wurde bei Seren aus Ferkelimpfbeständen und Nichtimpfbeständen im Vergleich mit Seren aus Sauenimpfbeständen signifikant häufiger PCV2b nachgewiesen. Während KEKARAINEN et al. (2014) sowohl in ungeimpften Schweinen als auch bei geimpften Schweinen beide Genotypen nachweisen können, beschreiben andere Autoren eine Verschiebung des Auftretens von PCV2a zu PCV2b bei geimpften Tieren (OPRIESSNIG et al., 2013b; OPRIESSNIG et al., 2013a; REINER et al., 2015). Da die meisten PCV2-Impfstoffe auf dem Genotypen PCV2a basieren, könnte sich in

Ferkelimpfbeständen ein Selektionsvorteil für den Genotyp PCV2b ergeben. Allerdings konnte eine wirksame Kreuzprotektivität der meistens auf PCV2a-basierenden Impfstoffe in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen werden (FORT et al., 2008; OPRIESSNIG et al., 2013b). Auch eine bessere Replikationsfähigkeit von PCV2b im Vergleich zu PCV2a (CHEUNG & GREENLEE, 2011) könnte ein möglicher Grund für das häufigere Vorkommen von PCV2b bei Proben aus Ferkelimpfbeständen im Vergleich zu Proben aus Sauenimpfbeständen sein. Dies erklärt allerdings nicht das signifikant häufigere Vorkommen von PCV2b in Seren aus Nichtimpfbeständen im Vergleich mit Sauenimpfbeständen.

3. Phylogenetische Analyse der PCV2-Genomsequenzen

Anhand der phylogenetischen Analyse konnte gezeigt werden, dass zwischen allen vorhandenen Sequenzen aus Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz eine enge phylogenetische Verwandtschaft besteht. Außerdem konnte mithilfe des Alignments ein hoher Übereinstimmungsgrad zwischen den Nukleotiden der vorliegenden PCV2-Sequenzen und den internationalen auf GenBank verfügbaren PCV2-Sequenzen dargestellt werden. Verschiedene Autoren konnten mittels phylogenetischer Analysen zeigen, dass europäische Sequenzen sowohl innereuropäisch (DE BOISSESON et al., 2004; GRIERSON et al., 2004) als auch mit weiter entfernten Ländern (LAROCHELLE et al., 2002) phylogenetisch verwandt sind. Eine mögliche Erklärung für die enge phylogenetische Verwandtschaft zwischen deutschen und niederländischen Sequenzen könnte wiederum der rege Handel mit Schweinen und Schweineprodukten zwischen den beiden Ländern sein (ISN, 2017). Von verschiedenen Autoren wurde bereits dargelegt, dass sowohl der internationale Handel mit subklinisch infizierten Schweinen (FRANZO et al., 2015c) als auch der Handel mit infektiösem Sperma (MENG, 2012) ein Risiko für die Übertragung von PCV2 darstellt. Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen dem internationalen Handel mit Schweinen und der raschen Verbreitung

gleichartiger Sequenzen vermutet (FRANZO et al., 2016). Die phylogenetische Analyse im Rahmen der eigenen Untersuchungen zeigt außerdem eine hohe Sequenzidentität der deutschen und niederländischen Sequenzen mit den schweizerischen Genomen, trotz des Bestrebens der Schweiz, die Gefahr eines Eintrags anderer Krankheitserreger durch Import von Schweinen oder Schweineprodukten zu minimieren.

Beim Vergleich der Genomsequenzen aus Deutschland den Niederlanden und der Schweiz konnte festgestellt werden, dass auch innerhalb der Bestände die Homologie der PCV2-Isolate sehr groß zu sein scheint. Dies bestätigt auch SZIKORA (2015), in dessen Studie mehrere Sequenzpaare aus dem jeweils gleichen Bestand zu 100 % übereinstimmten. Auch in einer schwedischen Studie konnte gezeigt werden, dass die PCV2-Sequenz eines klinisch gesunden Schweins aus dem Jahr 1993 zu 99,1 % mit einer Sequenz aus dem Jahr 2004 desselben Bestandes übereinstimmte (TIMMUSK et al., 2008). Dies könnte an dem Produktionssystem der Bestände liegen. JAGANATHAN et al. (2011) kamen im Rahmen ihrer phylogenetischen Analysen zu dem Schluss, dass durch den Import von Zuchtschweinen PCV2 in das jeweilige Land eingebracht werden kann. Übertragen auf einen Bestand mit reiner Masthaltung könnte der Eintrag von PCV2-Isolaten, die sich von den in dem Bestand vorhandenen Isolaten phylogenetisch unterscheiden, aufgrund des Zukaufs von Schweinen leichter erfolgen als in ein geschlossenes System. In der vorliegenden Untersuchung wurde das Produktionssystem aufgrund fehlender Informationen aus den Niederlanden nicht in die Analysen miteinbezogen, weswegen ein Zusammenhang damit nur vermutet werden kann.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurde durch eine retrospektive Auswertung von Serumproben aus den Jahren 2015 bis 2017 das Vorkommen von PCV2-Genotypen bei Schweinen im Alter von 16 bis 24 Wochen untersucht. Die Proben stammten aus verschiedenen Gesundheitsmonitoring-Untersuchungen aus Beständen in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz mit unterschiedlichen Impfstatus als Ferkelimpfbestand, Sauenimpfbestand oder Nichtimpfbestand. Dabei lag bereits von allen Seren ein qPCR-Ergebnis vor. Von 136 Seren konnte eine Vollgenomsequenz erstellt werden. Anhand dieser Vollgenomsequenzen und mithilfe phylogenetischer Analysen konnten die Genotypen und die Cluster von PCV2 bestimmt werden.

Insgesamt waren 53,8 % (49/91) der Bestände PCV2-positiv. Bei der qualitativen Auswertung der positiven Bestände in Abhängigkeit vom Impfstatus und der Lokalisation des Bestandes in Deutschland, den Niederlanden oder der Schweiz ergaben sich signifikante Assoziationen. Auf Bestandesebene wurde zudem das Vorkommen von Genotypen und Cluster von PCV2 in den Beständen, aus denen sequenzierte Vollgenome vorlagen, untersucht. Dabei konnten in 45 % (21/47) der Bestände nur PCV2a, in 43 % (20/47) der Bestände nur PCV2b, in 4 % (2/47) der Bestände nur PCV2d und in jeweils 4 % (2/47) der Bestände gleichzeitig PCV2a und PCV2b bzw. PCV2b und PCV2d nachgewiesen werden. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten der PCV2-Genotypen in den Beständen und der Lokalisation eines Bestandes in Deutschland, den Niederlanden oder der Schweiz oder dem Impfstatus konnte nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchungen auf Einzeltierebene konnte gezeigt werden, dass der größte Teil der Seren (39%) einen durchschnittlichen Gehalt von PCV2-DNA von 10^4 Genomkopien / ml Serum enthielt, was sich außerhalb des als klinisch geltenden relevanten Bereiches (BRUNBORG et al., 2004; OLVERA et al., 2004; HARDING et al., 2008) befindet. In Seren, die nachweislich den

Genotypen PCV2b oder PCV2d enthielten, konnten signifikant mehr Genomkopien / ml Serum von PCV2 detektiert werden. Dies bestätigt die Vermutung, dass in Seren mit dem Genotypen PCV2b oder PCV2d eine höhere Viruslast vorhanden ist, als in Seren mit PCV2a. Auch in Abhängigkeit von Land und Impfstatus ergaben sich diesbezüglich signifikante Zusammenhänge, wobei beachtet werden muss, dass die Seren mit einem PCV2-Gehalt von 10^4 Genomkopien / ml Serum oder mehr zur Vollgenomsequenzierung ausgewählt wurden, da die Qualität der Sequenzierung mit der Quantität der Viruslast korreliert.

Bei der Untersuchung von Zusammenhängen zwischen detektierten Genotypen und Clustern in den Einzelseren und Land bzw. Impfstatus stellte sich heraus, dass in der Schweiz signifikant mehr Proben mit PCV2a zu finden waren. Außerdem konnte in Ferkel- und Nichtimpfbeständen im Vergleich zu Sauenimpfbeständen signifikant mehr Proben mit PCV2b detektiert werden. Damit konnte der Verdacht des selektiven Einflusses der Impfung auf das Vorkommen von PCV2b nur zum Teil bestätigt werden. Anhand der erstellten phylogenetischen Stammbäume konnte gezeigt werden, dass alle Sequenzen eine große Homologie aufweisen, was die Vermutung einer hohen Sequenzidentität zwischen deutschen und niederländischen Isolaten unterstützt. Die Vermutung, dass die Schweizer Sequenzen sich hinsichtlich der Sequenzidentität von den Sequenzen aus den anderen beiden Ländern aufgrund der isolierten Handelslage unterscheiden, konnte nicht bestätigt werden, da die Sequenzen aller drei Länder eine große Homologie zueinander aufwiesen.

VII. SUMMARY

In the present study the occurrence of PCV2-genotypes in pigs aged 16 to 24 weeks was investigated by a retrospective evaluation of serum samples from the period 2015 to 2017. The samples came from various health monitoring examinations from farms in Germany, the Netherlands and Switzerland which had different vaccination schedules as farms with active immunization, passive immunization or no immunization. There was already a qPCR result available from all sera. From 136 sera a full genome sequence could be created. Based on these full-genome sequences and phylogenetic analyzes, the genotypes and clusters of PCV2 could be determined.

Overall, 53.8% (49/91) of the herds were PCV2 positive. Qualitative evaluation of the positive herds showed significant associations in relation to the vaccination schedule and the site of the farm in Germany, the Netherlands or Switzerland. On farm level the occurrence of genotypes and clusters of PCV2 in the farms with available full genome sequences was also investigated. PCV2a could be found in 45% (21/47) of the farms, PCV2b in 43% (20/47) of the farms, PCV2d in 4% (2/47) of the farms and in 4% (2/47) of the farms PCV2a and PCV2b or PCV2b and PCV2d were detected at the same time. A significant correlation between the occurrence of the PCV2 genotypes in the herds and the localization of a farm in Germany, the Netherlands or Switzerland or the vaccination status could not be proven.

At the individual animal level, molecular biological studies showed that the majority of sera (39%) contained an average PCV2 DNA content of 10^4 genome copies / ml serum, which is outside the clinically relevant range (BRUNBORG et al., 2004; OLVERA et al., 2004; HARDING et al., 2008). In sera containing PCV2b or PCV2d genotypes significantly more genome copies / ml serum of PCV2 were detected. This confirms the assumption that in sera with the genotype PCV2b a higher viral load is present than in sera with PCV2a. Depending on the country and the vaccination schedule, there also were corresponding significant

correlations. However, it should be noted that sera with a PCV2 content of 10^4 genome copies / ml serum or more were selected for full genome sequencing because the quality of the sequencing correlates with the quantity of viral load.

Investigation of correlations between detected genotypes and clusters in the individual sera and country or vaccination status revealed that significantly more samples with PCV2a could be found in Switzerland. In addition, significantly more samples with PCV2b could be detected in farms with active immunization or no vaccination compared to farms with passive immunization. Thus, the suspicion of the selective influence of the vaccine on the occurrence of PCV2b could only partially be confirmed. On the basis of the phylogenetic trees it could be shown that all sequences have a high homology, which supports the assumption of a high sequence identity between German and Dutch isolates.

The assumption that the Swiss sequences differ in terms of sequence identity from the sequences from the other two countries due to the isolated commercial situation could not be confirmed, since the sequences of all three countries had a large homology to each other.

VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Verteilung der untersuchten Bestände nach Bundesländern in Deutschland (farbig ausgefüllt= mindestens ein untersuchter Bestand in diesem Bundesland; n=Anzahl der untersuchten Bestände in diesem Bundesland);.....</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 2: Verteilung der untersuchten Bestände nach Provinzen in den Niederlanden (farbig ausgefüllt= mindestens ein untersuchter Bestand in dieser Provinz; n=Anzahl der untersuchten Bestände in dieser Provinz);.....</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 3: Verteilung der untersuchten Bestände nach Kantonen in der Schweiz (farbig ausgefüllt= mindestens ein untersuchter Bestand in diesem Kanton; n=Anzahl der untersuchten Bestände in diesem Kanton);</i>	<i>26</i>
<i>Abbildung 4: prozentuale Verteilung der verschiedenen Impfstatus der untersuchten Bestände in den einzelnen Ländern.</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 5: Prozentualer Anteil der PCV2-positiv getesteten Bestände in Abhängigkeit von deren Standort in Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz.</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 6: prozentualer Anteil der PCV2-positiv getesteten Bestände in Abhängigkeit von deren Impfstatus als Ferkelimpfbestand, Sauenimpfbestand oder Nichtimpfbestand.</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 7: prozentuale Verteilung der detektierten PCV2-Genotypen in allen positiven Beständen, aus denen genotypisierte Proben vorlagen. .</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 8: prozentualer Anteil aller PCV2-positiven Proben pro Wertebereich in Genomkopien / ml Serum (*klinisch relevanter Bereich nach BRUNBORG et al. (2004); OLVERA et al. (2004); HARDING et al. (2008)).</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 9: prozentuale Verteilung der PCV2-positiven Proben nach Impfstatus als Ferkelimpfbestand (FI), Sauenimpfbestand (SI) oder Nichtimpfbestand (NI) pro Wertebereich in Genomkopien / ml Serum (*klinisch relevanter Bereich nach BRUNBORG et al. (2004); OLVERA et al. (2004); HARDING et al. (2008)).</i>	<i>43</i>

<i>Abbildung 10: prozentualer Anteil der Genotypen aller sequenzierten Proben pro Wertebereich in Genomkopien / ml Serum (*klinisch relevanter Bereich nach BRUNBORG et al. (2004); OLVERA et al. (2004); HARDING et al. (2008)).....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 11: prozentuale Anteile der PCV2-Genotypen in den sequenzierten Einzelseren in Abhängigkeit von deren Herkunft aus Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz.</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 12: prozentuale Anteile der PCV2-Cluster in den sequenzierten Einzelseren in Abhängigkeit von deren Herkunft aus Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 13: prozentuale Anteile der PCV2-Genotypen in den sequenzierten Einzelseren in Abhängigkeit von deren Impfstatus als Ferkelimpfbestand, Sauenimpfbestand und Nichtimpfbestand.</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 14: phylogenetischer Stammbaum basierend auf dem Vollgenom der PCV2-Isolate (Neighbor-Joining-Methode, p-distance-Modell, 1000 bootstraps).</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 15: phylogenetischer Stammbaum basierend auf dem ORF2 der PCV2-Isolate (Neighbor-Joining-Methode, p-distance-Modell, 1000 bootstraps).</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 16: Subtypisierung von PCV2b-Isolaten mittels phylogenetischer Analyse (Neighbor-Joining-Methode, p-distance-Modell, 1000 bootstraps) des Vollgenoms.....</i>	<i>58</i>

IX. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Aufstellung des Paul-Ehrlich-Institutes der in Deutschland und des College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG-MEB) der in den Niederlanden zugelassenen Impfstoffe gegen PCV2 ((a)=basierend auf dem Genotypen PCV2a, (b)=basierend auf dem Genotypen PCV2b)) (2018).</i>	<i>18</i>
<i>Tabelle 2: Aufstellung des Tierarzneimittel Kompendium der Schweiz der in der Schweiz zugelassenen Impfstoffe gegen PCV2 (2018).....</i>	<i>19</i>
<i>Tabelle 3: verwendeter Primermix.</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 4: Primer zur Amplifikation und Sequenzierung.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 5: Darstellung des angewandten Temperaturprotokolls.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 6: Definition der zur statistischen Analyse verwendeten unabhängigen und abhängigen Variablen.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 7: Verteilung der PCV2-Genotypen und Cluster in den untersuchten PCV2-positiven Beständen mit genotypisierten Proben ($n_{pos}=47$) in Abhängigkeit von der Probenherkunft aus Deutschland (D), den Niederlanden (NL) und der Schweiz (CH).</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 8: Verteilung der PCV2-Genotypen und Cluster in den untersuchten PCV2-positiven Beständen mit genotypisierten Proben ($n_{pos}=47$) in Abhängigkeit vom jeweiligen Impfstatus als Ferkelimpfbestand (FI), Sauenimpfbestand (SI) oder Nichtimpfbestand (NI).....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 9: Darstellung der mittleren Gehalte an PCV2-DNA in Genomkopien / ml Serum in den Einzelseren, aufgeteilt nach Genotypen in Deutschland (D), den Niederlanden (NL) und der Schweiz (CH).</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 10: Darstellung der mittleren Gehalte an PCV2-DNA in Genomkopien / ml Serum in den Einzelproben, aufgeteilt nach Genotypen und Impfstatus als Ferkelimpfbestand (FI), Sauenimpfbestand (SI) oder Nichtimpfbestand (NI).....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 11: Darstellung der mittleren Gehalte an PCV2-DNA in Genomkopien / ml Serum in den Einzelseren, aufgeteilt nach Clustern in Deutschland (D), den Niederlanden (NL) und der Schweiz (CH).</i>	<i>49</i>

<i>Tabelle 12: Darstellung der mittleren Gehalte an PCV2-DNA in Genomkopien / ml Serum in den Einzelproben, aufgeteilt nach Clustern und Impfstatus als Ferkelimpfbestand (FI), Sauenimpfbestand (SI) oder Nichtimpfbestand (NI).</i>	<i>50</i>
---	-----------

X. LITERATURVERZEICHNIS

Allan GM, McNeilly F, McMenamy M, McNair I, Krakowka SG, Timmusk S, Walls D, Donnelly M, Minahin D, Ellis J, Wallgren P, Fossum C. Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome-affected and -nonaffected farms in Ireland and Northern Ireland. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19: 668-673.

Bao F, Mi S, Luo Q, Guo H, Tu C, Zhu G, Gong W. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV2f. *Transbound Emerg Dis* 2017: 432-440.

Baumgartner M, Brugnera E, Sydler T, Bürgi E, Hässig M, Sidler X. Risk factors causing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) onset in Swiss pig farms. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2012; 154: 429-436.

Bisht SS, Panda AK. DNA sequencing: methods and applications. In: *Advances in Biotechnology*, 2014. eds. Ravi I, Baunthiyal M, Saxena J. New Delhi, Springer India. 11-23.

Bolin SR, Stoffregen WC, Nayar GPS, Hamel AL. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest* 2001; 13: 185-194.

Borel N, Bürgi E, Kiupel M, Stevenson GW, Mittal SK, Pospischil A, Sydler T. Three cases of "postweaning multisystemic wasting syndrome" (PMWS) due to porcine circovirus type 2 (PCV 2) in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2001; 143: 249-255.

Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods* 2004; 122: 171-178.

Calsamiglia M, Segalés J, Quintana J, Rosell C, Domingo M. Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1848-1850.

Calsamiglia M, Fraile L, Espinal A, Cuxart A, Seminati C, Martín M, Mateu E, Domingo M, Segalés J. Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Res Vet Sci* 2007; 82: 299-304.

Carman S, Cai HY, DeLay J, A.Youssef S, McEwen BJ, Gagnon CA, Tremblay D, Hazlett M, Lusi P, Fairles J, Alexander HS, van Dreumel T. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease — 2004–2006. *Can J Vet Res* 2008; 72: 259-268.

Chae C. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *Vet J* 2012; 194: 151-157.

Chae C. An emerging porcine circovirus type 2b mutant (mPCV2b) originally known as PCV2d. *Vet J* 2015; 203: 6-9.

Cheung AK. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology* 2003; 313: 452-459.

Cheung AK, Lager KM, Kohutyuk OI, Vincent AL, Henry SC, Baker RB, Rowland RR, Dunham AG. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol* 2007; 152: 1035.

Cheung AK, Greenlee JJ. Identification of an amino acid domain encoded by the capsid gene of porcine circovirus type 2 that modulates intracellular viral protein distribution during replication. *Virus Res* 2011; 155: 358-362.

Chiou MT, Yang CY, Chang TC, Chen C, Lin CF, Ye LJ. Shedding pattern and serological profile of porcine circovirus type 2 infection in cesarean-derived, colostrum-deprived and farm-raised pigs. *J Vet Med Sci* 2011; 73: 521-525.

Cortey M, Pileri E, Sibila M, Pujols J, Balasch M, Plana J, Segalés J. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. *Vet J* 2011; 187: 363-368.

Csagola A, Cadar D, Tuboly T. Replication and transmission of porcine circovirus type 2 in mice. *Acta Vet Hung* 2008; 56: 421-427.

Davies B, Wang X, Dvorak CMT, Marthaler D, Murtaugh MP. Diagnostic phylogenetics reveals a new Porcine circovirus 2 cluster. *Virus Res* 2016; 217: 32-37.

De Boisseson C, Beven V, Bigarre L, Thiery R, Rose N, Eveno E, Madec F, Jestin A. Molecular characterization of porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J Gen Virol* 2004; 85: 293-304.

Dias AS, Gerber PF, Araújo AS, Auler PA, Gallinari GC, Lobato ZIP. Lack of antibody protection against porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in naturally infected dams and their offspring. *Res Vet Sci* 2013; 94: 341-345.

Dieste-Pérez L, van Nes A, van Maanen K, Duinhof T, Tobias T. The prevalence of PCV2 viremia in newborn piglets on four endemically infected Dutch sow farms is very low. *Prev Vet Med* 2018; 153: 42-46.

Dupont K, Nielsen EO, Bækbo P, Larsen LE. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* 2008; 128: 56-64.

Dupont K, Hjulsager CK, Kristensen CS, Bækbo P, Larsen LE. Transmission of different variants of PCV2 and viral dynamics in a research facility with pigs mingled from PMWS-affected herds and non-affected herds. *Vet Microbiol* 2009; 139: 219-226.

Dvorak CMT, Lilla MP, Baker SR, Murtaugh MP. Multiple routes of porcine circovirus type 2 transmission to piglets in the presence of maternal immunity. *Vet Microbiol* 2013; 166: 365-374.

Dvorak CMT, Yang Y, Haley C, Sharma N, Murtaugh MP. National reduction in porcine circovirus type 2 prevalence following introduction of vaccination. *Vet Microbiol* 2016; 189: 86-90.

Eddicks M, Fux R, Szikora F, Eddicks L, Majzoub-Altweck M, Hermanns W, Sutter G, Palzer A, Banholzer E, Ritzmann M. Detection of a new cluster of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol* 2015; 176: 337-343.

Eddicks M, Koeppen M, Willi S, Fux R, Reese S, Sutter G, Stadler J, Ritzmann M. Low prevalence of porcine circovirus type 2 infections in farrowing sows and corresponding pre-suckling piglets in Southern German pig farms. *Vet Microbiol* 2016; 187: 70-74.

Eddicks M, Szikora F, Walhöfer N, Sauter Louis C, Reese S, Banholzer E, Reiner G, Sutter G, Ritzmann M, Fux R. Vorkommen von Genotypen des porzinen Circovirus Typ 2 (PCV2) in Schweinebeständen mit unterschiedlichen Impfstrategien gegen PCV2. *Tierärztl Prax Ausg G* 2017; 45: 90-97.

Ellis J, Spinato M, Yong C, West K, McNeilly F, Meehan B, Kennedy S, Clark E, Krakowka S, Allan G. Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15: 364-368.

Fachinger V, Bischoff R, Jedidia SB, Saalmüller A, Elbers K. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine* 2008; 26: 1488-1499.

Feng H, Blanco G, Segalés J, Sibila M. Can porcine circovirus type 2 (PCV2) infection be eradicated by mass vaccination? *Vet Microbiol* 2014; 172: 92-99.

Fort M, Sibila M, Allepuz A, Mateu E, Roerink F, Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine* 2008; 26: 1063-1071.

Fraile L, Sibila M, Nofrarias M, Lopez-Jimenez R, Huerta E, Llorens A, Lopez-Soria S, Perez D, Segales J. Effect of sow and piglet porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on piglet mortality, viraemia, antibody titre and production parameters. *Vet Microbiol* 2012; 161: 229-234.

Franzo G, Cortey M, De Castro AMMG, Piovezan U, Szabo MPJ, Drigo M, Segalés J, Richtzenhain LJ. Genetic characterisation of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. *Vet Microbiol* 2015a; 178: 158-162.

Franzo G, Cortey M, Olvera A, Novosel D, De Castro AMMG, Biagini P, Segalés J, Drigo M. Revisiting the taxonomical classification of porcine circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. *Viol J* 2015b; 12: 131.

Franzo G, Tucciarone CM, Dotto G, Gigli A, Ceglie L, Drigo M. International trades, local spread and viral evolution: the case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy. *Infect Genet Evol* 2015c; 32: 409-415.

Franzo G, Cortey M, Segalés J, Hughes J, Drigo M. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. *Mol Phylogenet Evol* 2016; 100: 269-280.

Gagnon CA, Tremblay D, Tijssen P, Venne MH, Houde A, Elahi SM. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J* 2007; 48: 811-819.

Gerber PF, Garrocho FM, Lana ÂMQ, Lobato ZIP. Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. *Vet J* 2011; 188: 240-242.

Grierson SS, King DP, Wellenberg GJ, Banks M. Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. *Res Vet Sci* 2004; 77: 265-268.

Grierson SS, Werling D, Bidewell C, Williamson S. Characterisation of porcine circovirus type 2 in porcine circovirus disease cases in England and Wales. *Vet Rec* 2018; 182: 22.

Guo LJ, Lu YH, Wei YW, Huang LP, Liu CM. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Viol J* 2010; 7: 273.

Guo LJ, Fu Y, Wang Y, Lu Y, Wei Y, Tang Q, Fan P, Liu J, Zhang L, Zhang F, Huang L, Liu D, Li S, Wu H, Liu C. A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in capsid protein showed more virulence in vivo, compared with classical PCV2a/b strain. *PLoS One* 2012; 7: e41463.

Haake M, Palzer A, Rist B, Weissenbacher-Lang C, Fachinger V, Eggen A, Ritzmann M, Eddicks M. Influence of age on the effectiveness of PCV2 vaccination in piglets with high levels of maternally derived antibodies. *Vet Microbiol* 2014; 168: 272-280.

Hamel AL, Lin LL, Nayar GPS. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 1998; 72: 5262-5267.

Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GP. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res* 2000; 64: 44-52.

Hammer R, Ritzmann M, Palzer A, Lang C, Hammer B, Pesch S, Ladinig A. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections in wild boar (*Sus scrofa*) in southwestern Germany. *J Wildl Dis* 2012; 48: 87-94.

Handke M, Engels M, Prohaska S, Keller C, Brugnera E, Sydler T, Sidler X. Infection related fertility disorders in Swiss pig breeding farms at the end of the postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) epizooty. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2012; 154: 437-444.

Harding JCS. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol* 2004; 98: 131-135.

Harding JCS, Baker CD, Tumber A, McIntosh KA, Parker SE, Middleton DM, Hill JE, Ellis JA, Krakowka S. Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity, and nucleocapsid staining intensity. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20: 274-282.

Harmon KM, Gauger PC, Zhang J, Piñeyro PE, Dunn DD, Chriswell AJ. Whole-genome sequences of novel porcine circovirus type 2 viruses detected in swine from Mexico and the United States. *Genome Announcements* 2015; 3: e01315-15.

ISN. Niederlande: Mehr Ferkel exportiert-Deutschland bleibt wichtigster Abnehmer. ISN - Interessengemeinschaft der Schweinehalter Deutschlands e. V. <https://www.schweine.net/news/niederlande-mehr-ferkel-exportiert.html>. Accessed 24.09.2018.

Jacobsen B, Krueger L, Seeliger F, Bruegmann M, Segalés J, Baumgaertner W. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol* 2009; 138: 27-33.

Jaganathan S, Toung OP, Yee PL, Yew TD, Yoon CP, Keong LB. Genetic characterization of porcine circovirus 2 found in Malaysia. *Viol J* 2011; 8: 10.

Kekarainen T, Gonzalez A, Llorens A, Segales J. Genetic variability of porcine circovirus 2 in vaccinating and non-vaccinating commercial farms. *J Gen Virol* 2014; 95: 1734-1742.

Khaiseb S, Sydler T, Zimmermann D, Pospischil A, Sidler X, Brugnera E. Coreplication of the major genotype group members of porcine circovirus type 2 as a prerequisite to coevolution may explain the variable disease manifestations. *J Virol* 2011; 85: 11111-11120.

Kim D, Ha Y, Lee YH, Chae S, Lee K, Han K, Kim J, Lee JH, Kim SH, Hwang KK, Chae C. Comparative study of In situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of porcine circovirus 2 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Vet Med Sci* 2009; 71: 1001-1004.

Kiupel M, Stevenson GW, Choi J, Latimer KS, Kanitz CL, Mittal SK. Viral replication and lesions in BALB/c mice experimentally inoculated with porcine circovirus isolated from a pig with postweaning multisystemic wasting disease. *Vet Pathol* 2001; 38: 74-82.

Kixmüller M, Ritzmann M, Eddicks M, Saalmüller A, Elbers K, Fachinger V. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 2008; 26: 3443-3451.

Kurmann J, Sydler T, Brugnera E, Buergi E, Haessig M, Suter M, Sidler X. Vaccination of dams increases antibody titer and improves growth parameters in finisher pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18: 1644-1649.

Kwon T, Lee DU, Yoo SJ, Je SH, Shin JY, Lyoo YS. Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population. *Virus Res* 2017; 228: 24-29.

Larochelle R, Magar R, D'Allaire S. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res* 2002; 90: 101-112.

Li J, Yuan X, Zhang C, Miao L, Wu J, Shi J, Xu S, Cui S, Wang J, Ai H. A mouse model to study infection against porcine circovirus type 2: viral distribution and lesions in mouse. *Viol J* 2010; 7: 158.

Lin WL, Chien MS, Wu PC, Lai CL, Huang C. The porcine circovirus type 2 nonstructural protein ORF3 induces apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells. *Open Virol J* 2011; 5: 148-153.

Lipej Z, Segales J, Jemersic L, Olvera A, Roic B, Novosel D, Mihaljevic Z, Manojlovic L. First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in croatia and phylogenetic analysis of partial PCV2 sequences. *Acta Vet Hung* 2007; 55: 389-400.

Liu J, Chen I, Du QY, Chua HK, Kwang J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J Virol* 2006; 80: 5065-5073.

Liu JK, Wei CH, Dai AL, Lin ZF, Fan KW, Fan JL, Liu JY, Luo ML, Yang XY. Detection of PCV2e strains in Southeast China. *PeerJ* 2018; 6: e4476.

Liu X, Wang FX, Zhu HW, Sun N, Wu H. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from China with high homology to PCV2c. *Arch Virol* 2016; 161: 1591-1599.

Lorincz M, Csagola A, Biksi I, Szeredi L, Dan A, Tuboly T. Detection of porcine circovirus in rodents - short communication. *Acta Vet Hung* 2010; 58: 265-268.

Lukert P, de Bour GF, Dale JL, Keese P, McNulty MS, Randles JWT, Tisher I. The circoviridae. In: Virus taxonomy. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses., 1995. eds. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD. Springer Verlag. 166-168.

Lv QZ, Guo KK, Xu H, Wang T, Zhang YM. Identification of putative ORF5 protein of porcine circovirus type 2 and functional analysis of GFP-fused ORF5 protein. PLoS One 2015; 10: e0127859.

Lv QZ, Guo KK, Zhang GF, Zhang YM. The ORF4 protein of porcine circovirus type 2 antagonizes apoptosis by stabilizing the concentration of ferritin heavy chain through physical interaction. J Gen Virol 2016; 97: 1636-1646.

Madec F, Rose N, Grasland B, Cariolet R, Jestin A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience. Transbound Emerg Dis 2008; 55: 273-283.

Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. Vet Pathol 2009a; 46: 707-716.

Madson DM, Ramamoorthy S, Kuster C, Pal N, Meng XJ, Halbur PG, Opriessnig T. Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars. Vet Res 2009b; 40: 10.

Magar R, Larochelle R, Thibault S, Lamontagne L. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. J Comp Pathol 2000; 123: 258-269.

Mankertz A, Mankertz J, Wolf K, Buhk HJ. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J Gen Virol* 1998; 79: 381-384.

Martelli P, Saleri R, Ferrarini G, De Angelis E, Cavalli V, Benetti M, Ferrari L, Canelli E, Bonilauri P, Arioli E, Caleffi A, Nathues H, Borghetti P. Impact of maternally derived immunity on piglets' immune response and protection against porcine circovirus type 2 (PCV2) after vaccination against PCV2 at different age. *BMC Vet Res* 2016; 12: 77.

McKeown NE, Opriessnig T, Thomas P, Guenette DK, Elvinger F, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clinl Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1347–1351.

McNeilly F, Kennedy S, Moffett D, Meehan BM, Foster JC, Clarke EG, Ellis JA, Haines DM, Adair BM, Allan GM. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Virol Methods* 1999; 80: 123-128.

Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM, Allan GM. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 1998; 79: 2171-2179.

Meng X-J. Spread like a wildfire—The omnipresence of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its ever-expanding association with diseases in pigs. *Virus Res* 2012; 164: 1-3.

Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 2000; 81: 2281-2287.

Nawagitgul P, Harms PA, Morozov I, Thacker BJ, Sorden SD, Lekcharoensuk C, Paul PS. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 33-40.

O'Neill KC, Hemann M, Gimenez-Lirola LG, Halbur PG, Opriessnig T. Vaccination of sows reduces the prevalence of PCV-2 viraemia in their piglets under field conditions. *Vet Rec* 2012; 171: 5.

Oh Y, Seo HW, Park C, Chae C. Comparison of sow and/or piglet vaccination of 3 commercial porcine circovirus type 2 (PCV2) single-dose vaccines on pigs under experimental PCV2 challenge. *Vet Microbiol* 2014; 172: 371-380.

Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segales J, Domingo M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods* 2004; 117: 75-80.

Olvera A, Cortey M, Segalés J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 2007; 357: 175-185.

Olvera A, Busquets N, Cortey M, De Deus N, Ganges L, Núñez JI, Peralta B, Toskano J, Dolz R. Applying phylogenetic analysis to viral livestock diseases: moving beyond molecular typing. *Vet J* 2010; 184: 130-137.

Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19: 591-615.

Opriessnig T, Ramamoorthy S, Madson DM, Patterson AR, Pal N, Carman S, Meng XJ, Halbur PG. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J Gen Virol* 2008a; 89: 2482-2491.

Opriessnig T, Madson DM, Prickett JR, Kuhar D, Lunney JK, Elsener J, Halbur PG. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. *Vet Microbiol* 2008b; 131: 103-114.

Opriessnig T, Patterson AR, Jones DE, Juhan NM, Meng XJ, Halbur PG. Limited susceptibility of three different mouse (*Mus musculus*) lines to Porcine circovirus-2 infection and associated lesions. *Can J Vet Res* 2009; 73: 81-86.

Opriessnig T, Patterson AR, Madson DM, Pal N, Ramamoorthy S, Meng XJ, Halbur PG. Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Vet Microbiol* 2010; 142: 177-183.

Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Vet Microbiol* 2013a; 163: 177-183.

Opriessnig T, O'Neill K, Gerber PF, De Castro AMMG, Giménez-Lirola LG, Beach NM, Zhou L, Meng XJ, Wang C, Halbur PG. A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. *Vaccine* 2013b; 31: 487-494.

Opriessnig T, Langohr I. Current state of knowledge on porcine circovirus type 2-associated lesions. *Vet Pathol* 2013; 50: 23-38.

Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG, Matzinger SR, Meng XJ. Mutant USA strain of porcine circovirus type 2 (mPCV2) exhibits similar virulence to the classical PCV2a and PCV2b strains in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. *J Gen Virol* 2014; 95: 2495-2503.

Opriessnig T, Xiao CT, Halbur PG, Gerber PF, Matzinger SR, Meng XJ. A commercial porcine circovirus (PCV) type 2a-based vaccine reduces PCV2d viremia and shedding and prevents PCV2d transmission to naïve pigs under experimental conditions. *Vaccine* 2017; 35: 248-254.

Palinski R, Piñeyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, Byers E, Hause BM. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *J Virol* 2017; 91: e01879-01816.

Park JS, Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, Lim JK, Kim SH, Chae C. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J Comp Pathol* 2005; 132: 139-144.

Patterson AR, Madson DM, Halbur PG, Opriessnig T. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after natural exposure. *Vet Microbiol* 2011; 149: 225-229.

Pejsak Z, Podgorska K, Truszczyński M, Karbowski P, Stadejek T. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010; 33: e1-e5.

Phan TG, Giannitti F, Rossow S, Marthaler D, Knutson TP, Li L, Deng X, Resende T, Vannucci F, Delwart E. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virology* 2016; 13: 184.

Qu T, Li R, Yan M, Luo B, Yang T, Yu X. High prevalence of PCV2d in Hunan province, China: a retrospective analysis of samples collected from 2006 to 2016. *Arch Virol* 2018; 163: 1897-1906.

Reiner G, Bronnert B, Hohloch C, Fresen C, Haack I, Willems H, Reinacher M. Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol* 2010; 145: 1-8.

Reiner G, Hofmeister R, Willems H. Genetic variability of porcine circovirus 2 (PCV2) field isolates from vaccinated and non-vaccinated pig herds in Germany. *Vet Microbiol* 2015; 180: 41-48.

Ritzmann M, Vorbuchner K, Majzoub M, Hermanns W, Heinritzi K, Geißler K, Truyen U. Untersuchungen zur Verbreitung des porzinen Circovirus Typ 2 in Bayern. *Tierärztl Prax Ausg G* 2002; 30: 386-391.

Rodriguez-Arrioja GM, Segales J, Rosell C, Rovira A, Pujols J, Planaduran J, Domingo M. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med Ser B-Infect Dis Vet Public Health* 2003; 50: 99-101.

Rose N, Opriessnig T, Grasland B, Jestin A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res* 2012; 164: 78-89.

Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, Balasch M, Rodríguez-Arriola GM, Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Latimer KS, Domingo M. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 1999; 120: 59-78.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74: 5463-5467.

Schmoll F, Lang C, Steinrigl AS, Schulze K, Kauffold J. Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology* 2008; 69: 814-821.

Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 2012; 164: 10-19.

Segalés J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L, Domingo M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 2005; 111: 223-229.

Segalés J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 2007; 6: 119-142.

Segalés J, Olvera A, Grau-Roma L, Charreyre C, Nauwynck H, Larsen L, Dupont K, McCullough K, Ellis J, Krakowka S, Mankertz A, Fredholm M, Fossum C, Timmusk S, Stockhofe-Zurwieden N, Beattie V, Armstrong D, Grassland B, Baekbo P, Allan G. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec* 2008; 162: 867.

Seo HW, Han K, Oh Y, Kang I, Park C, Joo HE, Kim SH, Lee BH, Chae C. Evaluation of commercial polyclonal- and monoclonal-antibody-based immunohistochemical tests for 2 genotypes of porcine circovirus type 2 and comparison with in-situ hybridization assays. *Can J Vet Res* 2014; 78: 233-236.

Shen H-G, Halbur PG, Opriessnig T. Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA. *J Gen Virol* 2012; 93: 1345-1355.

Shen H, Wang C, Madson DM, Opriessnig T. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *Prev Vet Med* 2010; 97: 228-236.

Shibata I, Okuda Y, Yazawa S, Ono M, Sasaki T, Itagaki M, Nakajima N, Okabe Y, Hidejima I. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J Vet Med Sci* 2003; 65: 405-408.

Shibata I, Okuda Y, Kitajima K, Asai T. Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. *J Vet Med Ser B-Infect Dis Vet Public Health* 2006; 53: 278-280.

Sinha A, Shen HG, Schalk S, Beach NM, Huang YW, Meng XJ, Halbur PG, Opriessnig T. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) influences infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) subtypes PCV2a and PCV2b by prolonging PCV2 viremia and shedding. *Vet Microbiol* 2011; 152: 235-246.

Szczotka A, Stadejek T, Pejsak Z. A comparison of immunohistochemistry and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus type 2 in pigs. *Pol. J. Vet. Sci.* 2011; 14: 565-571.

Szikora F. Studie zum Vorkommen der Genotypen PCV2a und PCV2b des porcinen Circovirus Typ 2 in schweinehaltenden Betrieben mit unterschiedlichen PCV2-Impfregimen. Diss. med. vet. 2015. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Thangthamniyom N, Sangthong P, Poolperm P, Thanantong N, Boonsoongnern A, Hansoongnern P, Semkum P, Petcharat N, Lekcharoensuk P. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Thailand during 2009–2015. *Vet Microbiol* 2017; 208: 239-246.

Timmusk S, Wallgren P, Brunborg IM, Wikström FH, Allan G, Meehan B, McMenamy M, McNeilly F, Fuxler L, Belák K, Põdersoo D, Saar T, Berg M, Fossum C. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Genes* 2008; 36: 509-520.

Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 1974; 226: 153-167.

Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 1982; 295: 64-66.

Truong QL, Seo TW, Yoon BI, Kim HC, Han JH, Hahn TW. Prevalence of swine viral and bacterial pathogens in rodents and stray cats captured around pig farms in Korea. *J Vet Med Sci* 2013; 75: 1647-1650.

Verreault D, Létourneau V, Gendron L, Massé D, Gagnon CA, Duchaine C. Airborne porcine circovirus in Canadian swine confinement buildings. *Vet Microbiol* 2010; 141: 224-230.

Vicente J, Segales J, Hofle U, Balasch M, Plana-Duran J, Domingo M, Gortazar C. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Res* 2004; 35: 243-253.

Walker IW, Konoby CA, Jewhurst VA, McNair I, McNeilly F, Meehan BM, Cottrell TS, Ellis JA, Allan GM. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12: 400-405.

Wang F, Guo X, Ge X, Wang Z, Chen Y, Cha Z, Yang H. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res* 2009; 145: 151-156.

Wang S, Luo XN, Wei W, Zheng YD, Dou YX, Cai XP. Calculation of evolutionary correlation between individual genes and full-length genome: a method useful for choosing phylogenetic markers for molecular epidemiology. *PLoS One* 2013; 8: e81106.

Wellenberg GJ, Pesch S, Berndsen FW, Steverink P, Hunneman W, Van der Vorst TJK, Peperkamp N, Ohlinger VF, Schippers R, Van Oirschot JT, de Jong MF. Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in the Netherlands. *Vet Q* 2000; 22: 167-172.

Wellenberg GJ, Stockhofe-Zurwieden N, Boersma WJA, de Jong MF, Elbers ARW. The presence of co-infections in pigs with clinical signs of PMWS in The Netherlands: a case-control study. *Res Vet Sci* 2004; 77: 177-184.

Welti S, Sydler T, Wiederkehr DD, Pospischil A, Hässig M, Bürgi E, Sidler X. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) in Switzerland in the years 2003-2006. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2012; 154: 417-427.

West KH, Bystrom JM, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan GM, Haines DM, Clark EG, Krakowka S, McNeilly F, Konoby C, Martin K, Ellis JA. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 530-532.

Wiederkehr DD, Sydler T, Bürgi E, Hässig M, Zimmermann D, Pospischil A, Brugnera E, Sidler X. A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. *Vet Microbiol* 2009; 136: 27-35.

Xiao C, Halbur PG, Opriessnig T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *J Gen Virol* 2015; 96: 1830-1841.

Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. *J Virol* 2012; 86: 12469-12469.

Xiao CT, Harmon KM, Halbur PG, Opriessnig T. PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the U.S. during 2014–2016. *Vet Microbiol* 2016; 197: 72-77.

Yu S, Opriessnig T, Kitikoon P, Nilubol D, Halbur PG, Thacker E. Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 115: 261-272.

Zhai SL, Chen SN, Liu W, Li XP, Deng SW, Wen XH, Luo ML, Lv DH, Wei WK, Chen RA. Molecular detection and genome characterization of porcine circovirus type 2 in rats captured on commercial swine farms. *Arch Virol* 2016; 161: 3237-3244.

Fragebogen zum Bestand

[illegible]

Ausgefüllter Originalfragebogen der Schweiz

Probennummer	Betrieb	Tierzahl	System (geschlossen=0, offen=1)	Circo-Impfung 1= Ferkelimpfer 2= Sauenimpfer 3= Nichtimpfer 4= unbekannter Impfstatus	Wenn geimpft wird, welcher Impfstoff?	Ferkelherkunft 0= betriebseigen 1= national (falls ja, welcher Kanton?) 2= international	Fütterherkunft 0= nur betriebs-eigen hergestellt 1=Zukauf (falls ja, woher?)	Spermaherkunft 0= Besamungsstation 1= betriebseigene Samengewinnung 2= Natursprung mit betriebs-eigenem Eber	Falls Besamungsstation, welche?
A		110 Muttersauen 300 Mast	0	1	CircoFlex	1 Früher Jungsauenzukauf Kanton Lu	1Zukauf Fertigfütter Fütermühle LANDI Sempach	0	SUISAG
B		80 Muttersauen 250 Mast	0	1	CircoFlex	Kein Tierzukauf	1 Zukauf Fertigfütter Fütermühle Trullikon	0	SUISAG +Tiefgefriersperma ADN (Bretagne)
C		285 Muttersauen 100 Mast	1	1	CircoFLEX	1 Jungsauenzukauf Kanton LU	1Zukauf Fertigfütter Egli Mühlen AG	0	SUISAG
D		600 Mast	1	1	CircoFlex	1 Kanton LU	1 Zukauf Fertigfütter Egli Mühlen	-	-
E		1200 Mast	1	1	Diverse meist CircoFlex	1 Kanton Thurgau	0	-	-
F		120 Muttersauen 360 Mast	1	1	CircoFlex	Zukauf Jungsauen	1 Zukauf Fertigfütter UFA Biblis	0	SUISAG
G		1500 Mast	1	1	Diverse meist CircoFlex	1 Kanton Bern und Aargau	0	-	-
H		220 Muttersauen 200 Mast	1	1	CircoFlex	1 Jungsauenzukauf Bern	1 Zukauf Fertigfütter Melior	0	SUISAG

I	255 Muttersauen 100 Mast	1	2 CircoFlex 2. Drittel Trächtigkeit	CircoFlex	1 Jungsauenzukauf Kanton Thurgau	1 Zukauf Fertigfutter	0	SUISAG
J	200 Muttersauen 600 Mast	1	1	CircoFlex	Jungsauenzukauf Kanton Luzern	1 Zukauf Fertigfutter	0	SUISAG
K	600 Mast	1	1	CircoFlex	1 Mastferkellieferant Kanton SG	1 Zukauf Fertigfutter	-	-
L	560 Mast	1	4	?	diverse	Zukauf Fertigfutter	-	-

□

Ausgefüllter Originalfragebogen den Niederlanden

Farm	Size of stock	number of fattening pigs	System (farrow to finish=0, only fattening pigs=1) Only farrow: sows + piglets, until fattening Production of gilts: gilts/pigs until age of first insemination	Circo-vaccination 1= piglets vaccinations 2=sow vaccination 3= no vaccination 4=not known, if they vaccinate (only for the farms C, H,M,Q,S,T,U,X-I already got the informations of the other farms)	Name of the vaccine (for ex. Circoflex or Porcilis)	Origin of the piglets 0=farrow to finish 1=national (if yes, which province/region) 2=international (if yes which country)	Origin of the pig feed 0= only own production of the farm 1=national 2=international	Origin of the sperm/semen 0= station for insemination 1=own boars on the farm	?
A			Only farrow						
B			0						
C			1						
D			0						
E			1						
F			Production of gilts						
G			1						
H			1						
I			Only farrow						
J			Only farrow						
K			Production of gilts						
L			Only farrow						
M			Only farrow						
N			1						
O			0						
P			0						
Q			0						
S			0						
T			0						
U			1						
V			0						
W			Only farrow						
X			1						
Y			1						

XII. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Mathias Ritzmann bedanken, der es mir ermöglichte, diese Doktorarbeit unter seiner Leitung an der Klinik für Schweine zu schreiben. Außerdem möchte ich ihm danken, dass er mir und allen Kolleginnen und Kollegen stets mit Rat und Tat zur Seite stand und immer für ein gutes Arbeitsklima in der Klinik sorgte.

Von Herzen danke ich auch meinem Betreuer Dr. Matthias Eddicks, der mich durch konstruktive Gedanken und Gespräche und mit viel Geduld im Verlauf der ganzen Doktorarbeit stets unterstützt und begleitet hat.

Auch bei Dr. Robert Fux vom Lehrstuhl für Virologie möchte ich mich für die großartige Unterstützung bedanken, da er zum Gelingen meiner Arbeit zu einem großen Teil beigetragen hat.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Gerald Reiner und Prof. Dr. Hermann Willems von der Justus-Liebig-Universität Gießen für ihre Hilfe bei der Probenbearbeitung. Ebenso danke ich Prof. Dr. Xaver Sidler und Dr. Dolf Kümmerlen von der Abteilung für Schweinemedizin der Universität Zürich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Proben. Bei der Firma MSD Tiergesundheit möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung der Proben und der finanziellen Mittel bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen an der Schweineklinik, die immer für mich da waren und mit denen ich eine tolle und unvergessliche Zeit an der Klinik für Schweine verbringen durfte. Auch allen nicht namentlich erwähnten Einzelpersonen möchte ich herzlich danken.

Zuletzt will ich mich bei meiner Familie, besonders bei meinen Eltern, bei meinem Freund Juli und all meinen Freunden für die jahrelange Unterstützung, das unerschöpfliche Verständnis und die nie endende Geduld bedanken. Ohne euch an meiner Seite hätte ich das alles nicht geschafft, ihr seid wirklich nicht zu ersetzen!